

Aus dem Bereich: Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin - Zentrallabor

Prof. Dr. Rima Obeid

Institut für Medizinische Biometrie, Epidemiologie und Medizinische Informatik

P.D. Dr. Stefan Gräber

Medizinische Fakultät der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

Auswirkung einer Folat-, Vitamin B<sub>12</sub>- und Vitamin B<sub>6</sub>-

Supplementation auf den Knochenstoffwechsel

zusätzlich zur

Basistherapie mit Vitamin D und Kalzium

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades einer Doktorin der Medizin

der Medizinischen Fakultät

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2013

vorgelegt von: Vera Kruse

geboren am 29.08.1977 in Soltau

Für meine Familie

# Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
BAP	knochenspezifischen Isoform der alkalischen Phosphatase
BMD	Knochendichte
BMI	Body-mass-index
Ca <sup>2+</sup>	Kalzium
Cbl	Cobalamin
CRP	C-reaktives Protein
d	Tag
DPD	Desoxypyridinolin
DVO	Dachverband Osteologie e.V.
DXA	Dual-energy-X-Ray-Absorptiometrie
EDTA	Ethylen-diamin-tetra-essigsäure
g	Gramm, Gravitation
(Gamma-) γ-GT	Gamma-Glutamyltransferase
Gko	Glukokortikoide
Hcy	Homocystein
HHcy	Hyperhomocysteinämie
HDL	High-density-lipoprotein
holoTC	Holotranscobalamin
IE	Internationale Einheiten
IF	Intrinsischer Faktor
IS	Interne Standards
l	Liter
LDL	Low-density-lipoprotein
Meth	Methionin
mg	Milligramm
MMA	Methylmalonsäure
MS	Methionin-Synthase
MTHFR	Methylen-Tetrahydrofolat-Reduktase
MTX	Methotrexat
ng	Nanogramm
OC	Osteocalcin
OSP	Osteoporose
p	p-Wert
PL	Pyridoxal

PLP	Pyridoxalphosphat
PTH	Parathormon
SAH	S-Adenosyl-Homocystein
SAM	S-Adenosyl-Methionin
SCL	Sclerostin
TC	Transcobalamin
tHcy	Gesamthomocystein
THF	Tetrahydrofolat
TRAP5b	Isoform 5b der Tartrat-resistenten sauren Phosphatase
VitB <sub>12</sub>	Vitamin B <sub>12</sub>
VitB <sub>6</sub>	Vitamin B <sub>6</sub>
VitD	Vitamin D

# Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis .....	I
Inhaltsverzeichnis .....	III
Zusammenfassung .....	1
Abstract .....	2
1. Einleitung .....	3
1.1 Osteoporose .....	3
1.1.1 Formen .....	4
1.1.2 Ursachen der Osteoporose .....	5
1.1.2.1 Hormonmangel als Ursache für Osteoporose .....	5
1.1.2.2 Behandlung mit Glukokortikoiden und/oder Substanzen zur Arthritis- bzw. Krebstherapie als Ursache für Osteoporose .....	6
1.1.2.3 Weitere Ursachen für Osteoporose .....	7
1.1.3 Diagnostik der Osteoporose .....	9
1.1.3.1 Basisdiagnostik .....	9
1.1.3.3 Knochenmarker: frühe Indikatoren des veränderten Knochenstoffwechsels ..	11
1.1.4 Therapie der Osteoporose .....	15
1.1.4.1 Therapie der Osteoporose durch Kalzium- und Vitamin-D-Supplementation ..	15
1.1.4.2 Behandlung der Osteoporose durch Hormonersatztherapie .....	16
1.1.4.3 Behandlung der Osteoporose mit selektiven Östrogen-Rezeptor-Modulatoren .....	16
1.1.4.4 Behandlung der Osteoporose mit Antiresorptiva .....	17
1.1.4.5 Behandlung der Osteoporose mit Anabolika und Teilanabolika .....	17
1.1.4.6 Behandlung der Osteoporose mit Antikörpern .....	17
1.1.5 Kosten, die durch Osteoporose für das Gesundheitssystem entstehen .....	18
1.1.6 Prävention der Osteoporose .....	18
1.2 Die Rolle von Vitaminen und Mineralien bei Osteoporose .....	19
1.2.1 Vitamin D .....	19
1.2.2 Kalzium .....	20
1.2.3 Weitere ernährungsbedingte Faktoren mit klinischer Relevanz für den Knochenstoffwechsel .....	22
1.2.4 Homocystein .....	22
1.2.4.1 Homocysteinmetabolismus .....	23
1.2.4.2 S-Adenosyl-Methionin und S-Adenosyl-Homocystein .....	24
1.2.5 Folat .....	26
1.2.5.1 Lebensmittel als Folatquellen .....	26

1.2.5.2 Resorption der Folate im Darm und Aufnahme in den Blutkreislauf.....	27
1.2.5.3 Speicherformen der Folate im Körper .....	27
1.2.5.4 Klinische Symptome des Folatmangels.....	27
1.2.6 Vitamin B <sub>12</sub> .....	28
1.2.6.1 Lebensmittel als Vitamin- B <sub>12</sub> -Quellen .....	28
1.2.6.2 Resorption von Vitamin B <sub>12</sub> im Darm .....	29
1.2.6.3 Bedeutung des Holotranscobalamin.....	29
1.2.6.4 Klinische Symptome des Vitamin-B <sub>12</sub> -Mangels .....	29
1.2.7 Vitamin B <sub>6</sub> .....	30
1.3 Fragestellung und Ziel der Studie .....	32
2. Material und Methodik .....	33
2.1 Studiendesign.....	33
2.2 Probandenrekrutierung, Verlauf .....	34
2.2.1 Vitamintabletten.....	35
2.2.2 Ein- und Ausschlusskriterien für Probanden .....	36
2.2.3 Materialgewinnung, Datenerhebung.....	36
2.2.4 Präanalytik.....	37
2.3 Laborchemische Methodik .....	38
2.3.1 Messung von Metaboliten.....	38
2.3.1.1 Messung von Homocystein, Cystathionin und Methylmalonylsäure.....	38
2.3.1.2 Messung von S-Adenosyl-Methionin und S-Adenosyl-Homocystein.....	40
2.3.2 Messung von Vitaminen im Serum.....	43
2.3.2.1 Messung von Folat .....	43
2.3.2.2 Messung von Vitamin B <sub>12</sub> .....	43
2.3.2.3 Messung von Holotranscobalamin .....	43
2.3.2.4 Messung von Vitamin D (25-Hydroxy-Vitamin D) .....	44
2.3.3 Messung von Knochenmarkern im Serum und Urin.....	44
2.3.3.1 Messung der knochenspezifischen alkalischen Phosphatase.....	44
2.3.3.2 Messung von Osteocalcin .....	45
2.3.3.3 Messung der Isoform 5b der Tartrat-resistenten sauren Phosphatase .....	45
2.3.3.4 Messung von Sclerostin .....	45
2.3.3.5 Messung von Deoxypyridinolin-Crosslinks im Urin.....	46
2.3.4 Messung weiterer Routineparameter im Blut .....	46
2.3.5 Statistik .....	47
3. Ergebnisse .....	48
3.1 Allgemeine Charakteristik der Teilnehmerpopulation .....	48
3.2 Charakteristik der Teilnehmerpopulation.....	49

3.3 Charakteristik der Metabolite und Vitamine .....	50
3.3.1 Gesamt-Homocystein-Konzentration und Gesamt-Folat-Konzentration zu Studienbeginn und nach 12 Monaten .....	52
3.3.2 S-Adenosyl-Methionin- und S-Adenosyl-Homocystein-Konzentration zu Studienbeginn und nach 12 Monaten .....	54
3.3.3 Methylmalonsäure-Konzentration und Vitamin-B <sub>12</sub> -Konzentration im Serum zu Studienbeginn und nach 12 Monaten .....	56
3.3.4 Vitamin-D-Konzentration zu Studienbeginn und nach 12 Monaten .....	58
3.3.5 Konzentration der Knochenmarker zu Studienbeginn und nach 12 Monaten .....	60
3.4 Korrelation verschiedener Parameter .....	61
4. Diskussion .....	62
5. Referenzen .....	73
6. Anhang: .....	88
6.1 Informationen für den Hausarzt .....	88
6.2 Patienteninformation und Einwilligungserklärung .....	89
6.3 Randomisierungsbogen .....	92
6.4 Telefoncheckliste .....	93
7. Publikationsliste .....	94
8. Danksagung .....	104
9. Lebenslauf .....	105

## Zusammenfassung

In der älteren Bevölkerung sind ein Mangel an Vitamin D und B-Vitaminen weit verbreitet und begünstigen die Entstehung von Osteoporose und anderen altersassoziierten Erkrankungen. Die Supplementation dieser Vitamine stellt eine vielversprechende Strategie der Prävention dar. Das Augenmerk unserer Studie richtete sich auf den Effekt, den eine Supplementation von B-Vitaminen zusätzlich zu einer Supplementation von Vitamin D und Kalzium auf den Knochenstoffwechsel und weiteren Metabolismus bei älteren Menschen erzielt.

Für die doppelblinde Studie wurden 111 Probanden (54-85 Jahre) auf zwei Gruppen randomisiert verteilt. Eine Gruppe erhielt täglich Vitamin D (1200 IE) und Kalziumkarbonat (456 mg) (Gruppe B), die andere Gruppe erhielt täglich Vitamin D (1200 IE), Kalziumkarbonat (456 mg), Vitamin B<sub>12</sub> (0,5 mg), Vitamin B<sub>6</sub> (50 mg) und Folsäure (0,5 mg) (Gruppe A) in Tablettenform. Nüchternblut und Morgenurin wurden zu Beginn der Studie, nach 6 und nach 12 Monaten gesammelt, um den Vitaminstatus, Metabolite und Knochenmarker zu messen.

Zu Studienbeginn wies das Mittel der Probanden einen Vitamin D-Mangel auf. Außerdem waren die Werte für Parathormon im Plasma erhöht. Wir konnten eine inverse Korrelation zwischen Vitamin D und Parathormon feststellen. S-Adenosyl-Homocystein und S-Adenosyl-Methionin korrelierten mit Parathormon, Sclerostin und Bone Alkaline Phosphatase.

In beiden Gruppen stiegen die Vitamin D-Spiegel im Mittel signifikant an (87,6% Gruppe A, 133,3% Gruppe B) und sanken die Parathormon-Spiegel signifikant ab (28,3% Gruppe A, 49,4% Gruppe B). Die Probanden wiesen zu Studienbeginn eine moderate Hyperhomocysteinämie auf (12,6 µmol/l Gruppe A, 12,3 µmol/l Gruppe B). In der Probandengruppe, die B-Vitamine substituierte (A), sanken die Gesamthomocystein-Spiegel nach 12 Monaten signifikant ( $p < 0,001$ ) um 29,4%. Weitere Knochenmarker sanken wie folgt: Osteocalcin um 37,5% (A) und um 49,4% (B), knochenspezifischen Isoform der alkalischen Phosphatase um 2,8% (A) und um 16,2% (B), Tartrat-resistente saure Phosphatase um 6,1% (A) und um 36% (B).

Die Supplementation von Vitamin D über ein Jahr bewirkte eine signifikante Verlangsamung des Knochenstoffwechsels, vermittelt über eine Senkung der Parathormon-Spiegel und ist langfristig zu empfehlen. Durch die Supplementation von B-Vitaminen konnte eine Hyperhomocysteinämie korrigiert werden. Wir konnten keine weiterführende Beeinflussung des Knochenstoffwechsels durch eine zusätzliche Vitamin-B-Supplementation feststellen. Es besteht jedoch eine Tendenz, dass Individuen mit starker Hyperhomocysteinämie durch die Supplementation von B-Vitaminen einen Nutzen haben. Sinkende Gesamthomocystein-Spiegel und dadurch verminderter störender Einfluss auf das Kollagen-cross-linking, vermindern wahrscheinlich das Risiko des Individuums, eine Osteoporose zu entwickeln.



## Abstract

In the elderly, deficiencies of vitamins D and B are widespread and contribute to the development of osteoporosis and other age-associated diseases. Supplementation of these vitamins is a promising strategy for prevention. Our study focused on the effect of supplementation of B vitamins in addition to supplementation of vitamin D and calcium carbonate on bone turnover and other metabolisms in the elderly.

In a double-blind study 111 subjects (54-85 years) were randomized into two groups. One group (group B) received daily vitamin D (1200 IU) and calcium carbonate (456 mg), the other group (group A) received daily vitamin D (1200 IU), calcium carbonate (456 mg), vitamin B<sub>12</sub> (0.5 mg), vitamin B<sub>6</sub> (50 mg), and folic acid (0.5 mg) in tablet form. Fasting blood and fresh morning urine were collected at baseline, after 6 months, and after 12 months for the determination of the supplemented vitamins, their metabolites, and bone turnover markers.

At baseline, the median of the subjects had a vitamin D deficiency. In addition, the parathyroid hormone levels in plasma were increased. We found an inverse correlation between vitamin D and parathyroid hormone. S-adenosyl-homocysteine and S-adenosyl-methionine correlated with parathyroid hormone, sclerostin, and bone alkaline phosphatase.

In both groups levels of vitamin D increased significantly (87.6% in group A, 133.3 % in group B) and parathyroid hormone levels decreased significantly (28.3% in group A, 49.4% group B). At baseline, a moderate hyperhomocysteinemia was found in both groups (12.6  $\mu\text{mol/L}$  in group A, 12.3  $\mu\text{mol/L}$  in group B). In the group substituted with B vitamins (A) total homocysteine levels were significantly decreased by 29.4% after 12 months ( $p < 0.001$ ). Other bone markers decreased as follows: osteocalcin by 37.5 % (A) and 49.4 % (B), bone specific isoform of alkaline phosphatase by 2.8 % (A) and 16.2% (B), tartrate resistant acid phosphatase by 6.1 % (A) and 36% (B).

Supplementation of vitamin D for one year caused a significant deceleration of bone metabolism, mediated by a reduction in parathyroid hormone levels. Therefore, vitamin D supplementation is recommended in the long term. By supplementing B vitamins we corrected hyperhomocysteinemia. We could not detect any further influence on bone metabolism by an additional vitamin B supplementation. However, there is a tendency that the supplementation of B vitamins has a benefit for individuals with severe hyperhomocysteinemia. Decreasing total homocysteine levels and thereby reduced disruptive influence on the collagen cross-linking probably reduces the risk of individuals to develop osteoporosis.

# 1. Einleitung

## 1.1 Osteoporose

Der Begriff Osteoporose (OSP) leitet sich ab von osteos=Knochen und poros=Tuffstein. OSP stellt die häufigste Knochenerkrankungen im höheren Lebensalter (34;112) und die häufigste metabolische Osteopathie dar (es sind ca. 10% der Bevölkerung betroffen) (36). OSP rangiert bei Frauen auf Platz eins der chronischen Erkrankungen und bei Männern, nach der chronisch obstruktiven Lungenerkrankung (COPD), auf Platz zwei (132). Das Krankheitsbild OSP ist charakterisiert durch eine Reduktion der Knochenmasse (Osteopenie), einer Veränderung in der Mikroarchitektur des Spongiosaanteils des Knochens (Abbildung 1). Klinisch erscheint die OSP entweder asymptomatisch oder sie geht mit Körpergrößenverlust, verstärkter thorakaler Kyphose, radiologisch darstellbaren Wirbelkörperdeformitäten und belastungsabhängigen Rückenschmerzen einher (24). Weiterhin wird ein höheres Risiko für das Auftreten von Frakturen beschrieben, die schon durch ein sehr schwaches Trauma bedingt werden und in einer erhöhten Fragilität des Knochens begründet liegen (24;34;36;101;147). Osteoporotische Frakturen sind signifikant häufig mit einer Erhöhung der Morbidität, der Mortalität und der Wahrscheinlichkeit weiterer Frakturen (16) und einem Verlust von Mobilität und Unabhängigkeit verbunden, was signifikant häufiger zu dauerhafter Hospitalisierung führt (101). Für Schenkelhalsfrakturen wird eine 1-Jahres-Mortalitätsrate von 10-20% berichtet (71).

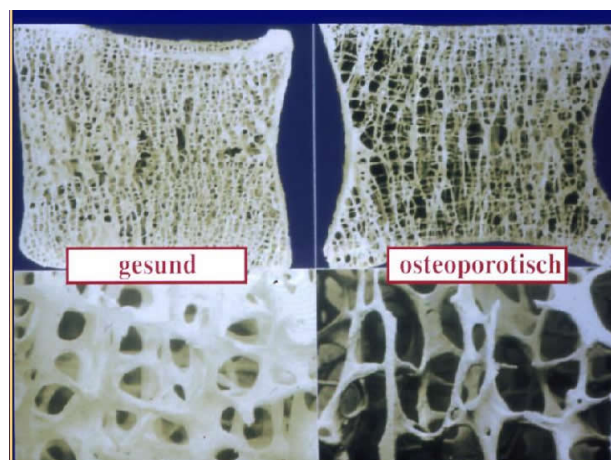


Abbildung 1: Mikroarchitektur eines gesunden gegenüber eines osteoporotisch veränderten Wirbelkörpers; auffällig ist die fehlende Quervernetzung der Spongiosabälkchen beim osteoporotisch veränderten Wirbelkörper; Burrows et al. (24).

### 1.1.1 Formen

Man unterscheidet eine primäre und eine sekundäre Form der OSP. Die häufigere Form der OSP ist die primäre Form mit einem Anteil von 95%. Unter der primären Form der OSP werden die postmenopausale OSP (Typ I OSP), die senile OSP (Typ II OSP) und die seltene idiopathische OSP junger Menschen zusammengefasst (71) (Tabelle 1). Achtzig Prozent aller OSP betreffen postmenopausale Frauen (34). Dreißig Prozent aller Frauen entwickeln nach der Menopause eine klinisch relevante OSP. Der Altersgipfel für das Auftreten einer postmenopausalen OSP Typ I liegt bei Frauen zwischen 50 und 60 Jahren. Die senile OSP nimmt ab einem Alter von 70 Jahren bei beiden Geschlechtern stetig zu (71). Jede 3.–4. Frau von 70 Jahren hat mindestens eine osteoporotische Fraktur. Die Inzidenz nichtvertebraler Frakturen bei Frauen über 65 Jahre beträgt 3.500 pro 100.000/Jahr (34;199). Bei der selteneren sekundären OSP (5%) stehen die Behandlung mit Glukokortikoiden (Gko) (>5 mg Prednisolon/d) und Immobilisation als Ursachen im Vordergrund. In 2% der Fälle einer sekundären OSP wird eine endokrine Ursache diagnostiziert, wobei Männer hier (mit 60%) als Betroffene deutlich überrepräsentiert sind. Endokrine Ursachen für eine sekundäre OSP sind: Hyperkortisolismus, Hypogonadismus, Hyperthyreose u.a. Als weitere Ursache kommt auch ein Malabsorptionssyndrom mit verminderter Zufuhr von Kalzium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) und 25-Hydroxy-Vitamin D<sub>3</sub> (VitD) in Betracht (71).

Tabelle 1: Formen der Osteoporose(71)

Form	Primäre OSP	Sekundäre OSP	mit OSP assoziierte Erkrankungen	Hereditäre Erkrankungen
Häufigkeit	94%	5%	<1%	<1%
Ausprägung	Postmenopausale OSP (Typ I); Senile OSP (Typ II); Idiopathische OSP junger Menschen (selten)	Endokrine Ursachen: Hyperkortisolismus, Hypogonadismus, Hyperthyreose, u.a.; Malabsorptionssyndrom, Immobilisation; Iatrogen/medikamentös (Glukokortikoid- (>5 mg Prednisolon/d) und/oder Heparin-Langzeittherapie)	Rheumatoide Arthritis; Morbus Crohn	Osteogenesis imperfecta; Ehlers-Danlos-Syndrom; Marfan-Syndrom; Homocystinurie

OSP: Osteoporose

### 1.1.2 Ursachen der Osteoporose

OSP ist eine Knochenstoffwechselerkrankung, die durch Störungen der Knochengeweberemodellierung gekennzeichnet ist. Es ist eine systemische Skeletterkrankung, die von einer geringen Knochenmasse und einem mikrostrukturellen Abbau des Knochengewebes begleitet ist (Abbildung 2), was zu einer erhöhten Frakturanfälligkeit führt (103).

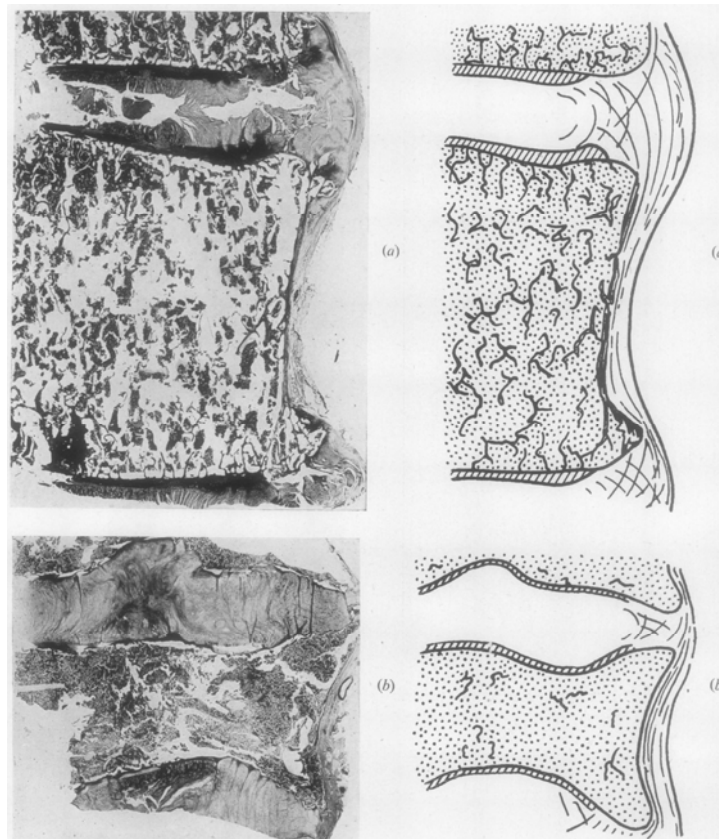


Abbildung 2: Histologischer Schnitt und schematische Darstellung jeweils eines gesunden (oben von links nach rechts) und eines osteoporotisch veränderten (unten von links nach rechts) senilen Wirbelkörpers (24)

#### 1.1.2.1 Hormonmangel als Ursache für Osteoporose

Der häufigste Typ der OSP tritt bei postmenopausalen Frauen auf und wird von einem, auf dem Ausbleiben der Ovarialfunktion beruhenden, Östrogenmangel verursacht. Die Ursache der primären Form Typ I liegt also in einer Veränderung der Steroidhormonkonzentration mit Eintritt der Menopause bei der Frau und mit zunehmendem Alter beim Mann (71). Die Prävalenz der OSP [Dual-energy-X-Ray-Absorptiometrie (DXA) T-Wert  $\leq -2,5$  gemäß WHO Definition] beläuft sich bei postmenopausalen Frauen in Deutschland auf ca. 7% für 55-jährige und

auf 19% für 80-jährige (48). Durch die Wiederherstellung der prämenopausalen Östrogenkonzentration mittels Substitutionstherapie kann ein Fortschreiten des Abbaus von Knochengewebe verlangsamt werden. Darüber hinaus verzögert eine Östrogensubstitution gleich nach Einsetzen der Menopause die Skelettatrophie. Bei Östradiolkonzentrationen  $<13$  ng/l findet bei Frauen eine gesteigerte Knochenresorption statt (35). Auch bei einem Drittel der Männer, die von OSP betroffen sind, wurden Östradiolkonzentrationen  $<13$  ng/l gemessen. Ein postmenopausal gesteigerter Knochenmasse- und Strukturverlust, vor allem am trabekulären Knochen, liegt in einer Enthemmung der Knochenresorption durch gesunkene Östrogenspiegel begründet. Man spricht hier von einer high-turnover-OSP. Der positive Einfluss der Östrogene auf differenzierte osteoblastäre Zellfunktion (Wachstumsfaktor-, Kollagen-Typ-1-Synthese) entfällt zunehmend und mündet in einer beeinträchtigten Knochenbildung (172). Der osteoanabolische Effekt der Androgene resultiert aus einem starken stimulierenden Effekt auf die Knochenbildung und einem schwächeren, den Knochenabbau hemmenden Effekt (106). Dieser nimmt beim alternden Mann aufgrund einer verminderten Androgenproduktion ab. Besonders betroffen sind hiervon Männer mit einer niedrigen Ausgangsknochenmasse und einem, sich auf die Knochenarchitektur negativ auswirkenden Lebensstil (Rauchen,  $\text{Ca}^{2+}$ - und VitD-arme Ernährung, Bewegungsmangel) (28).

#### *1.1.2.2 Behandlung mit Glukokortikoiden und/oder Substanzen zur Arthritis- bzw. Krebstherapie als Ursache für Osteoporose*

Bei 20% der sekundären OSP liegt die Ursache in einer Langzeittherapie ( $>3$  Monate) mit hochdosierten Gko (z.B.  $>5$  mg Prednisolon/d). Gko bewirken bei Menschen jeden Alters geschlechtsunabhängig einen gravierenden Verlust von trabekulärer Knochenmasse (2). Gko stören die empfindliche Balance zwischen Osteoblasten und –klasten und verschieben das Gleichgewicht langfristig in Richtung einer überwiegenden Knochenresorption. Die zwei Haupteffekte von Gko am Knochen sind 1. die Induktion der Apoptose von Osteoblasten und Osteozyten und 2. die Verlängerung der Lebensspanne von Osteoklasten (151). Darüber hinaus verursachen Gko auch eine Veränderung der Knochenstoffwechselfparameter in Serum und Urin und induzieren im Tiermodell eine Erhöhung der Marker für Autophagie von Osteozyten (211). Signifikante Risikofaktoren für das Auftreten von Frakturen nach einer langfristigen Gko-Therapie sind: Alter  $>65$  Jahre, positive Familienanamnese für OSP und geringer  $\text{Ca}^{2+}$ -Konsum (151).

Für Hochrisikopatienten bezüglich osteoporotischer Frakturen sollte vor einem Gko-Therapieintervall eine Medikation mit antiosteoporotischen Medikamenten wie z.B.

Bisphosphonaten erfolgen. Ein Therapieintervall sollte die Dauer von 3 Monaten nicht überschreiten und zwischen den Intervallen sollten jeweils 3 Monate Karenzzeit liegen (151). Studien zu Nichtsteroidalen Antirheumatika haben gezeigt, dass sowohl Cyclooxygenase-1- als auch Cyclooxygenase-2-Hemmer die Knochenbildung, die Frakturheilung und das Einwachsen von Knochen hemmen, wenn sie kontinuierlich eingenommen werden (3;59;193;201;205;210). Cyclosporin A ist ein zyklisches Pilz-Peptid, das die Aktivierung von T-Lymphozyten vornehmlich über eine Hemmung der Transkription des Interleukin-2-Gens verhindert. Bei transplantierten Patienten verursacht Cyclosporin A einen Knochenmasseverlust, indem es den Serumspiegel des Osteocalcins (OC) erhöht (176;190). Bei weiblichen Arthritis-Patientinnen zeigt Cyclosporin A in der Langzeitanwendung einen negativen Effekt auf die Knochendichte (BMD) (138). Methotrexat (MTX) ist ein Folsäureantagonist und verursacht OSP und Knochenschmerzen, wenn es in sehr hohen Dosen zur Krebstherapie angewendet wird. Im Tiermodell induzierte hochdosiertes MTX signifikant die Apoptose von Chondrozyten und Osteozyten und reduziert ihre Proliferationsrate (212). MTX bewirkt in niedrigerer Dosierung (ca. 10 mg/Woche), wie sie bei rheumatischen Patienten üblich ist, jedoch keine Abnahme der BMD (44) und keine Abnahme der Proliferation menschlicher Osteoblasten (115;136;208). Interleukin-6-Ausschüttung fördert die Formation von Osteoklasten und die Knochenresorption. MTX zeigt sogar einen „Knochen-sparenden“ Effekt, da durch inflammatorische Agonisten (Tumornekrosefaktor-alpha, Interleukin-1-alpha, u.a.) vermittelte osteoblastäre Interleukin-6 Ausschüttung supprimiert wird (214). Inflammation stellte sich als größerer Risikofaktor für eine niedrige BMD heraus, als z.B. Übergewicht (100).

### *1.1.2.3 Weitere Ursachen für Osteoporose*

Die Langzeitanwendung von Medikamenten, die zur Behandlung von psychiatrischen Erkrankungen verschrieben werden, kann den Knochenstoffwechsel beeinflussen. Bei vielen konventionellen (z.B. Haloperidol) aber auch bei neueren atypischen Antipsychotika (Risperidon, Clozapin) tritt als unerwünschte Nebenwirkung eine Hyperprolaktinämie auf, die wiederum mit einer Abnahme der BMD verbunden, mit einem erhöhten Frakturrisiko assoziiert ist (95;97;118;158). Lithium führt zu einer vermehrten Ausschüttung von PTH, was den Knochenabbau fördern kann. Bei der abschließenden Bewertung des Einflusses von Psychopharmaka auf die BMD müssen weitere, für viele psychiatrische Patienten charakteristische, Faktoren, die ebenfalls eine OSP fördern, mit berücksichtigt werden (Mangelernährung, Bewegungsarmut, Nikotinabusus, vornehmlicher Aufenthalt in geschlossenen Räumen) (150).

Die langfristige Behandlung epileptischer Erkrankungen mit antiepileptischen Medikamenten geht laut einer Vielzahl von Studien mit einer schlechten Knochenqualität einher. Patienten, die mit antiepileptischen Medikamenten behandelt werden, weisen einen abnormen Knochenstoffwechsel, eine niedrige BMD und ein deutlich erhöhtes Frakturrisiko auf (163). Das erhöhte Frakturrisiko wird auch durch eine höhere Sturzinzidenz bei tonisch-klonischen Anfällen, Immobilität, einer (genetischen Disposition zur) geringen BMD und einer ungenügenden Versorgung mit  $\text{Ca}^{2+}$  und VitD begründet. Autoren zeigten jedoch, dass in einer Hochrisikopopulation von Epileptikern, die schon unter OSP litten, die Zahl der aufgetretenen Knochenbrüche signifikant mit der Höhe der Tagesdosis an Antiepileptika korrelierte (11). Studien zu einzelnen antiepileptischen Medikamenten zeigen hier ein gemischtes Bild. Phenytoin, Phenobarbital und Primidon zeigen den deutlichsten Zusammenhang mit einer Verschlechterung der Knochenqualität. Bei Carbamazepin und Valproat ist die Studienlage gemischt. Lamotrigin zeigte in Studien keinen bzw. nur einen geringen negativen Einfluss auf die Knochenqualität (163).

Der Verdacht, dass die langfristige Einnahme von Statinen das Frakturrisiko beeinflusst, wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Einige Studien deuten auf eine Erniedrigung des Frakturrisikos, speziell in der synergistischen Kombination mit einer Hormontherapie, hin (9;130;146). Weitere Studien mit Daten von zusammengekommen über 3000 Patienten können einen signifikanten Unterschied/Zusammenhang in Bezug auf das Frakturrisiko bei Statinbehandlung im Vergleich mit Placebo jedoch nicht bestätigen (62;216). Cholesterinbindende Harze (Cholestyramin) führen zu niedrigen VitD-Plasmaspiegeln. Durch die Resorptionshemmung fettlöslicher Vitamine im Magen-Darm-Trakt wird ein VitD-Mangel protrahiert (83). Protonenpumpeninhibitoren (PPIs) reduzieren die Magensäureproduktion und sind ein gängiges Medikament zur Prophylaxe einer Schädigung des oberen Gastrointestinaltrakts. In den letzten 10 Jahren wuchs die Vermutung eines Zusammenhangs zwischen einer PPI-Therapie und dem vermehrten Auftreten von Frakturen (39;107). Eine Analyse vieler Studien der letzten Jahre ergab jedoch keinen signifikanten kausalen Zusammenhang zwischen der indirekten Wirkung der PPIs auf die Kalziumhomöostase und BMD bzw. den direkten Mechanismen der PPIs in Bezug auf den Knochenmetabolismus und dem vermehrten Auftreten von Frakturen (156;198). Im klinischen Alltag sollten PPIs trotzdem mit Bedacht und nur bei deutlicher Indikation und hohem zu erwartendem Nutzen eingesetzt werden (198).

### 1.1.3 Diagnostik der Osteoporose

Die Diagnostik der OSP beginnt mit allgemeinen Verfahren und geht dann über in speziell osteologisch-diagnostische Verfahren. Zu den speziellen Verfahren gehören die Messung der BMD und die Bestimmung von sogenannten „Knochenmarkern“ im Serum respektive Urin.

#### 1.1.3.1 Basisdiagnostik

Zur Basisdiagnostik gehören Anamnese (Erfassung von Risikofaktoren, Körpergröße, Gewicht, Beurteilung von Muskelkraft und Koordination mittels „Timed up & go“- „Chair-rising“- oder Tandemstandtest), klinischer Befund (Lokalisation und Ausmaß von Schmerzen und funktionellen Einschränkungen), bildgebende Verfahren (standardmäßig nur Röntgen), Basislabor [Serumkalzium und -phosphat, Alkalische Phosphatase, Gamma-Glutamyltransferase ( $\gamma$ -GT), Kreatinin-Clearence, C-reaktives-Protein (CRP), Blutbild, Thyreoid-stimulierendes Hormon, 25-Hydroxy-Vitamin-D, gegebenenfalls weitere Knochenstoffwechselparameter] und die Messung der BMD (48) (Tabelle 2).

Tabelle 2: Basisdiagnostik der Osteoporose

Anamnese	Erfassung von Risikofaktoren, Lebensstil, familiären Vorbelastungen, chronischen Krankheiten, Gewicht, Körpergröße, Medikation
Testung: Muskelkraft und Koordination	„Timed up & go“- „Chair-rising“- oder Tandemstandtest
Klinische Untersuchung	Lokalisation und Ausmaß von Schmerzen und funktionellen Einschränkungen
Bildgebung	Röntgen (Wirbelsäule, Hüfte)
Basislabor	Serumkalzium und -phosphat, AP, $\gamma$ -GT, Kreatinin-Clearence, CRP, Blutbild, Thyreoid-stimulierendes Hormon, VitD
BMD-Messung	Osteodensitometrie mittels DXA

AP: Alkalische Phosphatase; BMD: Bone Mineral Density; CRP: C-reaktives Protein; DXA: Dual-energie-X-ray-absorptiometrie;  $\gamma$ -GT: Gamma-Glutamyltransferase; VitD: Vitamin D



### 1.1.3.2 Osteodensitometrie als diagnostisches Standardverfahren

Das Standardverfahren zur BMD-Messung ist die Osteodensitometrie mittels DXA an der Lendenwirbelsäule und am proximalen Femur (48). Die DXA kann die momentane Dichte der Knochenmatrix an Wirbelkörper, Femur, Hüfte usw. zuverlässig und unter geringer Strahlenbelastung messen (31;129). Der T-Wert ist z.B. der Mittelwert der Dichten der Lendenwirbelkörper L1-L4. Für die operationalisierte Definition einer OSP gilt die WHO-Definition eines T-Wertes  $\leq -2,5$  (Knochenmasseverlust  $\geq 2,5$  Standardabweichungen unter der maximalen Knochenmasse des jungen Erwachsenen). Bei Vorliegen einer pertrochantären Femurfraktur oder bei Nachweis ein oder mehrerer typischer osteoporotischer Frakturen mittels Röntgenbild kann die Einleitung einer medikamentösen Anti-OSP-Therapie auch ohne eine vorherige DXA-Messung gerechtfertigt werden. Bei Hochrisikopatienten, bei denen die Durchführung einer DXA-Messung erschwert ist, kann als Vortest eine quantitative Ultraschallmessung zur (Erst-) Diagnostik sinnvoll sein (48). Knochengewebe unterliegt einem Stoffwechselprozess, der als prozesshafte Knochengeweberemodellierung beschrieben wird, welche in unterschiedlichen Phasen verläuft. Die Phasen eines Remodeling-Zyklus schließen Aktivierung, Resorption durch Osteoklasten, Umkehrphase und Reformation durch Osteoblasten ein. Diese ständige Remodellierung ist zum Erhalt der Gesamtintegrität der Knochenmatrix unverzichtbar. Die genau abgestimmte Kopplung zwischen Formations- und Resorptionsvorgängen steht in einem Gleichgewicht zueinander, das fein reguliert wird. Dieses Gleichgewicht wird durch viele, oben erwähnte Faktoren beeinflusst (55;102). Eine Störung dieses Gleichgewichts führt z.B. bei einem Übergewicht an Knochenresorption zu Ungunsten von Formationsvorgängen zu einem zügigen Gesamtverlust an Knochenmatrix. Frühe Beeinträchtigungen dieses Knochenstoffwechsels bzw. frühe Phasen einer Verbesserung der BMD zeigt die DXA nur sehr träge an (31;55;175).

### 1.1.3.3 Knochenmarker: frühe Indikatoren des veränderten Knochenstoffwechsels

#### *Die Knochenspezifische Isoform der alkalische Phosphatase als Indikator des veränderten Knochenstoffwechsels*

Jüngste Ergebnisse zeigen, dass eine frühe und schnelle Anzeige eines gestörten Gleichgewichts im Knochenstoffwechsel durch die Bestimmung spezifischer Parameter in Serum und Urin möglich ist (54). Bei der knochenspezifischen Isoform der alkalischen Phosphatase (BAP) handelt es sich um ein tetramerisches Glykoprotein, das auf der Oberfläche von Osteoblasten zu finden ist (171). BAP ist ein Indikator für die Osteoblastenaktivität. Da Osteoblasten die Zellen sind, die für die Bildung neuen Knochengewebes und dessen Mineralisation Verantwortung tragen, kann die Messung von BAP im Serum Aufschluss über den Umfang knochenauflösender Prozesse im Körper geben (113) (Tabelle 3). BAP bietet als quantitativer Marker des Knochenumsatzes wichtige Informationen zur Knochengeweberemodellierung, was z.B. zur Kontrolle antiresorptiver Therapien dienlich ist (54;113).

Tabelle 3: Referenzwerte für BAP

BAP	Serum	M	15,0-41,3 U/l
		F >45 Jahre	14,2-42,7 U/l

BAP: knochenspezifische Isoform der alkalischen Phosphatase; M: Männer; F: Frauen

#### *OC als Indikator des veränderten Knochenstoffwechsels*

OC ist ein extrahepatisches, Vitamin K abhängiges Protein. OC hat ein Molekulargewicht von 5800 Dalton, wird weitgehend von Osteoblasten gebildet, ein kleiner Anteil auch von Megakaryozyten und Thrombozyten (108;119). OC enthält drei  $\gamma$ -Carboxy-glutaminsäurereste, von denen man annimmt, dass sie an der Bindung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen und Hydroxylapatit beteiligt sind (119). Die *in vivo* Funktion von OC ist noch nicht endgültig geklärt. OC macht aber etwa 10-12% aller nicht kollagenen Proteine im Knochen aus und die Affinität von OC bezüglich mineralischer Bestandteile des Knochens lässt darauf schließen, dass es am Knochenaufbau beteiligt ist (40). Aktuelle Studien beschreiben eine Regulation des Insulin-vermittelten Energie-Metabolismus, eine Regulation der Glukose-Homöostase des Körpers durch Osteoblasten im Knochengewebe, die durch OC vermittelt wird (32).

Erhöhte OC-Spiegel können ein Hinweis auf eine vermehrte Knochenumsatztätigkeit darstellen, wie sie beim Hyperparathyreoidismus oder der high-turnover OSP vorkommen

(40;184;215). Reduzierte Konzentrationen von OC konnten bei Hypoparathyreoidismus und längerer Gko-therapie beobachtet werden (40). Hohe Plasmaspiegel des Gesamthomocysteins (tHcy) korrelieren mit hohen OC-Plasmaspiegeln (183).

Die OC-Konzentrationen sind abhängig von der renalen Kapazität und unterliegen einer zirkadianen Rhythmik mit hohen Werten in den frühen Morgenstunden. Die Referenzwerte für OC im Serum liegen für Männer und Frauen bei 3,7-10,0 ng/ml.

### *Die Isoform 5b der Tartrat-resistenten sauren Phosphatase als Indikator des veränderten Knochenstoffwechsels*

Die Isoform 5b der Tartrat-resistenten sauren Phosphatase (TRAP5b) befindet sich intrazellulär in Lysosomen und ist ein Marker für Makrophagen, dendritische Zellen und Osteoklasten (125). TRAP5b wird typischerweise im Verhältnis zur Osteoklastenaktivität exprimiert und in den Blutkreislauf sezerniert. Deshalb ist TRAP5b, ein 35-37 kDa schweres Glykoprotein, ein potentiell nützlicher Marker für die Knochenresorption (66;125;126) (Tabelle 4). TRAP5b zirkuliert im Serum als Komplex mit  $\alpha$ -2-Makroglobulin und  $\text{Ca}^{2+}$  (213). Erhöhte Konzentrationen können während des normalen Knochenwachstums bei Kindern oder auch bei bestimmten Krankheiten, die durch eine verstärkte Knochenresorption gekennzeichnet sind, beobachtet werden (65). Beispiele hierfür sind: primärer Hyperparathyreoidismus, Paget-Krankheit, metastasierende Malignome, OSP (67;121). Postmenopausale Frauen, die eine Östrogensersatztherapie erhalten, weisen niedrigere TRAP5b-Serumkonzentrationen auf, als unbehandelte postmenopausale Frauen (65).

Tabelle 4: Referenzwerte für TRAP5b

TRAP5b	Serum	M	2,6-5,4 U/l
		F >50 Jahre	2,8-5,8 U/l

TRAP5b: Isoform 5b der Tartrat-resistenten sauren Phosphatase; M: Männer; F: Frauen

### *Desoxypyridinolin als Indikator des veränderten Knochenstoffwechsels*

Desoxypyridinolin (DPD) gehört gemeinsam mit Pyridinolin und Pyridinium-Crosslinks zu den Crosslinks des Typ-I-Kollagens des Knochens (40;204). Dies bedeutet, dass das Typ-I-Kollagen im Knochen mit einigen spezifischen Molekülen vernetzt ist, die ihm Steifigkeit und Festigkeit verleihen. Typ-I-Kollagen selbst ist ein Protein in Form einer Tripelhelix, welches

90% der Knochenmatrix darstellt (204). DPD wird durch Lysyloxidase enzymatisch aus der Aminosäure Lysin gebildet (187). Bei der Knochenresorption wird DPD dann freigesetzt und im nicht metabolisierten Zustand ernährungsunabhängig (33) mit dem Urin ausgeschieden (187;204) (Tabelle 5).

Tabelle 5: Referenzwerte für DPD

DPD	Urin	M 22-55 Jahre	2,3-5,4 nmol/mmol Kreatinin
		F 25-44 Jahre	3,0-7,4 nmol/mmol Kreatinin

DPD: Desoxypyridinolin; M: Männer; F: Frauen

### *Sclerostin als Indikator des veränderten Knochenstoffwechsels*

Sclerostin (SCL) wird von der SOST-Genregion (17q12-21) codiert (206). SCL ist ein Glykoprotein, das hochgradig von Osteozyten sezerniert wird (Tabelle 6). SCL ist Mitglied der DAN Familie (differential screening-selected aberrative in neuroblastoma). SCL antagonisiert das Bone Morphogenetic Protein und/oder Wingless Protein (8). SCL bindet an den Wingless-Int-1-Corezeptor und blockiert die Wingless-Int-1-Signalkaskade (152;191). Diese Blockade hat z.B. Auswirkungen auf die Differenzierung von Osteoblasten. SCL reguliert die Osteoblastenfunktion indem es die Knochenformationsrate vermindert und gleichzeitig die Apoptose von Osteoblasten fördert (8). Aktuelle Studien untersuchen die Möglichkeit einer Hemmung von SCL durch monoklonale Antikörper und den daraus resultierenden positiven Effekt auf Knochenheilung und BMD (56;159;192). Eine mechanische Stimulation des Knochengewebes, freies Östrogen und auch PTH hemmen die Expression von SCL, wie Studien an postmenopausalen Frauen zeigten (149;167;192).

Tabelle 6: Referenzwerte für SCL

SCL	Serum	M	0,47-1,01 ng/ml
		F postmenopausal	0,49-0,89 ng/ml

SCL: Sclerostin; M: Männer; F: Frauen

## *Parathormon als Indikator des veränderten Knochenstoffwechsels*

PTH wird in den Nebenschilddrüsen als Präpro-PTH, einem Molekül aus 115 Aminosäuren, synthetisiert. Durch sequenzielle intrazelluläre Spaltung und weitere proteolytische Prozesse wird das Präpro-PTH erst in die Hormonvorstufe Pro-PTH (ein Polypeptid aus 90 Aminosäuren) und schließlich in PTH (ein Polypeptid aus 84 Aminosäuren) umgewandelt. Bei Gesunden erfolgt die Regulation der PTH-Sekretion über eine negative Rückkopplung des  $\text{Ca}^{2+}$ -spiegels im Serum auf die Nebenschilddrüsen (Abbildung 3). Das biologisch aktive intakte PTH wird mit einer Halbwertszeit von 4 Minuten rasch aus dem Kreislauf eliminiert (186). Der Abbau von PTH geschieht hauptsächlich peripher in Leber, Nieren, Knochen und im geringeren Umfang in den Nebenschilddrüsen durch proteolytische Spaltung. Bei diesem Abbau von PTH entstehen N-terminale und langlebige C-terminale und mittregionale Fragmente, deren Spiegel bei eingeschränkter renaler Clearance und Niereninsuffizienz erhöht sind.

Die Messung des intakten PTH ist zur Abgrenzung des primären Hyperparathyreoidismus von anderen (nicht durch die Nebenschilddrüsen bedingten) Ursachen der Hyperkalzämie (Hyperthyreose, bösartige Neubildungen, Sarkoidose u.a.) das spezifischste Verfahren. Die Referenzwerte für PTH im Serum liegen bei Männern und Frauen bei 10,4-66,5 ng/ml. Die Marker der Knochenformation bzw. -resorption sind in Tabelle 7 dargestellt.

Tabelle 7: Marker der Knochenformation bzw. -resorption

Marker der Knochenformation				Marker der Knochenresorption			
Knochenspezifische	Isoform	der	alkalische	Isoform	5b	der	Tartrat-resistenten sauren
Phosphatase (BAP)							
im Serum				Phosphatase (TRAP5b) im Plasma oder Serum			
Osteocalcin (OC) im Plasma oder Serum				Sclerostin (SCL) im Serum			
				intaktes Parathormon (PTH) im Plasma oder Serum			
				Deoxypyridinolin-(DPD)-Crosslinks im Urin			

### 1.1.4 Therapie der Osteoporose

Als Basistherapie werden generelle Maßnahmen zur Sturzprophylaxe empfohlen. Training von Muskelkraft und Koordination bilden das Fundament dieser generellen Maßnahmen zur Sturzprophylaxe. Diese „Bewegungstherapie“ sollte die anderen Therapien immer ergänzen, da Belastung der Knochensubstanz grundsätzlich einen Knochenaufbau fördert (172). Schmerzen schränken Bewegung ein, wodurch sich die negative Spirale aus mangelnder Bewegung, erhöhtem Knochenabbau und noch mehr Schmerzen weiter dramatisiert. Deshalb sollte die Bewegungstherapie von einer adäquat angepassten Schmerztherapie begleitet werden.

Ein weiterer Standpfeiler der Sturzprophylaxe ist die psychosoziale Betreuung. Durch psychosoziale Betreuung soll die Angst vor weiteren Sturzereignissen und Frakturen überwunden werden, die zu fortschreitender Immobilität führen kann. Bei Patienten mit Gko-therapie wird eine Einsparung von Gko durch Einsatz von Immunsuppressiva und bei Frauen mit Glitazontherapie eine Therapieumstellung empfohlen (48).

#### *1.1.4.1 Therapie der Osteoporose durch Kalzium- und Vitamin-D-Supplementation*

In den sechziger Jahren wurde ein niedriger  $\text{Ca}^{2+}$ -Konsum mit der Entstehung einer OSP in Verbindung gebracht (194). Heute empfiehlt der „Dachverband Osteologie e.V.“ (DVO) in seinen Leitlinien eine tägliche Zufuhr von 1000 mg  $\text{Ca}^{2+}$  mit der Nahrung. Es sollte nur supplementiert werden, wenn die Zufuhr über die Nahrung nicht gewährleistet werden kann. Die täglich  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme sollte dann auf 1200-1500 mg pro Tag optimiert werden. Die Menge an Nahrungs- $\text{Ca}^{2+}$  und Supplementierung sollte zusammen 1500 mg nicht überschreiten (48). Die individuelle Anamnese bezüglich Nierensteinen oder kardiovaskulärem Risiko muss berücksichtigt werden (41). Der Verdacht, eine leitliniengerechte Supplementation mit  $\text{Ca}^{2+}$  und VitD würde die Bildung kalzifizierter Plaques in Koronargefäßen begünstigen, konnte in einer doppelblinden, randomisierten Placebostudie an rund 750 postmenopausalen Frauen nicht bestätigt werden (137). Kalziumphosphat und Kalziumkarbonat unterstützen den Knochenaufbau vergleichbar effektiv. Kalziumphosphatsalz ist bei Patienten mit phosphatrestriktiver Diät zu bevorzugen (69). Aktuelle Studien zeigen eine Überlegenheit pflanzlicher  $\text{Ca}^{2+}$ -Quellen. Oxidativer Stress an Osteoblasten war *in vitro* bei Supplementation von „Algen- $\text{Ca}^{2+}$ “ signifikant geringer als bei Supplementation von  $\text{Ca}^{2+}$ -Karbonat bzw.  $\text{Ca}^{2+}$ -Zitrat (1). In den DVO-Leitlinien wird empfohlen, eine Serum-25-Hydroxy-VitD-Konzentration von 20 ng/ml und höher anzustreben. Durch die Gabe von 800-2000 IE VitD

pro Tag wird bei den meisten Menschen dieser von den DVO-Leitlinien empfohlene Serumspiegel erreicht (48). In Bezug auf die Knochengesundheit ist ein VitD-Serumspiegel von 20 ng/ml zufriedenstellend. Unter dem Blickwinkel der protektiven Effekte in Bezug auf zahlreiche andere Erkrankungen ist jedoch ein VitD-Serumspiegel von >40 ng/ml anzustreben (25). Die Deutsche Gesellschaft für Ernährung e.V. empfiehlt, Serumspiegel von 50 nmol/l als optimalen VitD-Versorgungsstatus (58).

#### *1.1.4.2 Behandlung der Osteoporose durch Hormonersatztherapie*

Östrogene wirken antiresorptiv und haben eine fraktursenkende Wirkung. Ausschlaggebend für ihre hemmende Wirkung auf die osteoklastäre Knochenresorption ist die Blockade der Entwicklung osteoklastärer Vorläuferzellen zu reifen Osteoklasten sowie die Induktion einer frühzeitigen Apoptose aktiver Osteoklasten (71). Wegen eines erhöhten Risikos für Herzinfarkt, Schlaganfall, tiefe Venenthrombose und Mamma-Karzinom wird heute jedoch von einer kombinierten Östrogen-Gestagen Therapie abgeraten. Schon in den Fünfziger Jahren war bekannt, dass eine OSP symptomatisch mit Substitution von Hormonen (Östrogenen) behandelt werden kann. In vielen Fällen trat eine sofortige Schmerzfreiheit ein, eine spinale Rekalzifizierung konnte langfristig festgestellt werden (135;145;209). Autoren zeigten, dass die Behandlung geringer BMD postmenopausaler Frauen mit gymnastischen Übungen,  $\text{Ca}^{2+}$ -Supplementation und Östrogen-Progesteron-Ersatztherapie zu einer signifikanten Verlangsamung des Knochenmasseverlusts führt. Hierbei zeigte die Gruppe, die mit gymnastischen Übungen und Östrogen-Progesteron-Ersatztherapie behandelt wurde, gegenüber der Gruppe, die mit gymnastischen Übungen und  $\text{Ca}^{2+}$ -Supplementation behandelt wurde, einen ausgeprägteren positiven Effekt, dem jedoch eine höhere Rate an Nebenwirkungen entgegensteht (172).

#### *1.1.4.3 Behandlung der Osteoporose mit selektiven Östrogen-Rezeptor-Modulatoren*

Heute sind selektive Östrogen-Rezeptor-Modulatoren wie Raloxifene und Tamoxifen fester Bestandteil der Therapie der postmenopausalen OSP. Selektive Östrogen-Rezeptor-Modulatoren wirken auf Knochen und Lipidstoffwechsel wie Östrogene. Die Östrogenwirkung an Mamma und Uterus wird jedoch aufgehoben. Das Risiko für gynäkologische Blutungen und Mamma-Karzinom wird gemindert (93).

#### *1.1.4.4 Behandlung der Osteoporose mit Antiresorptiva*

Bisphosphonate binden an Knochenmatrix, die sich im aktiven Umbau befindet, hemmen die Osteoklastenaktivität und reduzieren so den Knochenabbau (139). In einer nationalen Studie in Finnland wurde gezeigt, dass Patienten mit einer Hüftfraktur einen Überlebensvorteil von einer antiosteoporotischen Therapie haben. Ein tendenzieller Überlebensvorteil zeigte sich bei simultaner Gabe von  $\text{Ca}^{2+}$  und VitD oder VitD und Antiresorptiva (157).

#### *1.1.4.5 Behandlung der Osteoporose mit Anabolika und Teilanabolika*

Die Behandlung postmenopausaler Frauen mit Nebenschilddrüsenhormon schwächt das Risiko von Wirbelsäulen- und peripheren Frakturen, lässt die BMD ansteigen und ist gut verträglich (155). In einer Studie mit Hochrisikopatienten bezüglich Knochenbrüchen aufgrund GKO induzierten OSP konnte gezeigt werden, dass die BMD bei Patienten, die mit Teriparatid behandelt wurden, weit stärker zunahm, als bei Patienten, die mit Alendronat behandelt wurden (179).

#### *1.1.4.6 Behandlung der Osteoporose mit Antikörpern*

Neueste Studien belegen die Wirksamkeit monoklonaler Antikörper auf die Osteoklastendifferenzierung. Der monoklonale Antikörper Denosumab bindet an Liganden des Rezeptor-Aktivator-NF-Kappa-B und wirkt der Knochenresorption durch Hemmung der Osteoklastendifferenzierung entgegen. Einige Autoren beschreiben, dass Denosumab in postmenopausalen Frauen mit geringer Knochenmasse zu einer Erhöhung der BMD (im lumbalen Wirbelkörper um 3-6%, in der Hüfte um 3-4%) und einer Reduktion der Knochenresorption (in positiver Korrelation zur Dosis) führt und sich damit als potenzielles Therapeutikum gegen OSP erweist (140). In der DECIDE-Studie (23) mit 1189 postmenopausalen Frauen ohne Vortherapie wurde unter Therapie mit Denosumab gegenüber Alendronat eine signifikant stärkere Zunahme (+3,5% vs. +2,6%,  $p < 0,0001$ ) der BMD der Hüfte dokumentiert. Diese Beobachtungen wurden durch weitere Studien bestätigt (20;160). Wurde Denosumab postmenopausalen Frauen mit OSP zweimal jährlich als subkutane Injektion verabreicht, reduzierte es das Risiko vertebraler, nichtvertebraler und Hüftfrakturen signifikant (2,3% neue Frakturen in der Denosumab Gruppe vs. 7,2% in der Placebo Gruppe,  $p < 0,001$ ) (21;37). Die nur halbjährlich nötigen subkutanen Injektionen des Wirkstoffes Denosumab sind Spitzenreiter bezüglich



Akzeptanz und Compliance von Seiten der Patienten (109). Odanacatib hemmt Cathepsin K. Cathepsin K spielt bei den zwei Phasen der Knochenresorption (Lösung mineralischer Bestandteile und Auflösung der zellulären Matrixstruktur) eine entscheidende Rolle (165).

### **1.1.5 Kosten, die durch Osteoporose für das Gesundheitssystem entstehen**

In Deutschland wurden die direkten und indirekten Kosten für die Behandlung von OSP und osteoporotisch bedingter Hüftfrakturen im Jahr 2002 auf insgesamt 265 Millionen Euro geschätzt. Sie werden sich voraussichtlich bis zum Jahr 2050 verdoppeln (68;120). Allein die „screen-and-treat-strategy“, die in Deutschland laut Empfehlungen der DVO zur sekundären Prävention osteoporotischer Frakturen etabliert werden soll, wird zu 175 Millionen jährlichen Kosten allein für Frauen im Alter von 50-90 Jahren führen (0,14% des Budgets im Gesundheitssystem) (153). In den USA wurden für das Jahr 2008 nationale Kosten von 22 Milliarden Dollar für die Behandlung von OSP und daraus resultierter Frakturen geschätzt (17;30). Diese Zahlen untermauern die Notwendigkeit der Identifikation und Modifikation von Risikofaktoren und einer Weiterentwicklung prophylaktischer Maßnahmen gegen OSP.

### **1.1.6 Prävention der Osteoporose**

Empfohlen werden regelmäßige körperliche Aktivitäten zur Förderung von Koordination und Muskelkraft und zur Vermeidung einer Immobilisation. Ab ca. 70 Jahren sollte eine jährliche Sturzanamnese erfolgen, um ein erhöhtes Sturzrisiko diagnostisch abzuklären (134). Ein VitD-Mangel begünstigt Stürze. Der Ausgleich eines VitD-Defizits vermindert die Sturzrate (41) und beugt dem Knochenabbau vor. Untergewicht durch Mangelernährung sollte verhindert werden, da ein Body-mass-index (BMI)  $<20 \text{ kg/m}^2$  einen starken Risikofaktor für osteoporotische Frakturen darstellt. Ein Diabetes mellitus (DM) Typ 2 gilt als Risikofaktor für eine Verschlechterung der BMD bei nicht-adipösen postmenopausalen Frauen. Der Entstehung eines DM Typ 2 sollte besonders bei normalgewichtigen postmenopausalen Frauen präventiv entgegengewirkt werden, da diese im Vergleich zu adipösen Frauen mit DM Typ 2 ein niedrigeres BMD-Level und eine stärker ausgeprägte OSP aufweisen (217). Weiterhin sollten Personen der Risikogruppe eine ausreichende Zufuhr von  $\text{Ca}^{2+}$  und B-Vitaminen gewährleisten und auf den Einsatz OSP fördernder Medikamente verzichten (48;134).

## **1.2 Die Rolle von Vitaminen und Mineralien bei Osteoporose**

### **1.2.1 Vitamin D**

Bei dem lipophilen VitD handelt es sich nicht um ein Vitamin im klassischen Sinne. Es hat im Körper die Funktion einer Hormonvorstufe bei der Bildung des Hormons Calcitriol. 25-Hydroxy-Vitamin D<sub>3</sub> stellt die Speicherform dar, welche Rückschlüsse auf die Versorgung mit VitD der letzten Wochen und Monate zulässt. Der größte Teil des vom Menschen benötigten VitD wird über verschiedene Zwischenschritte durch den Einfluss von ultravioletem Licht (UVB) in der Epidermis synthetisiert (70;96;177). Eine ungenügende Sonnenlichtexposition der Haut z.B. bei alten und bettlägerigen Menschen, durch Kleidung (203), durch Sonnencremes mit sehr hohen Lichtschutzfaktoren oder generell in den Wintermonaten führt fast unumgänglich zu Mangelzuständen. Bei Personen in sonnenreichen Gegenden wurden natürlich regulierte VitD-Serumlevel von 40-70 ng/ml gemessen (25).

Ein Mangel führt mittelfristig bei Kindern zu Rachitis und bei Erwachsenen zu Osteomalazie. Weitere Erkrankungen, die mit einem VitD-Mangel assoziiert wurden, sind: erhöhtes kardiovaskuläres Risiko (13;45;105;114;168), erhöhter systolischer Blutdruck (104), Autoimmunerkrankungen (Multiple Sklerose, Systemischer Lupus erythematosus, Rheumatoide Arthritis, Chronisch entzündliche Darmerkrankungen) (5;7;197), metabolisches Syndrom (105), Kolonkarzinom bei Männern (164), einer Zahl anderer bösartiger Neubildungen, wie z.B. Brustkrebs, Nierenkrebs, Leukämie, Pankreas-/Ovarialkarzinom und Karzinomen des Kopf-/Halsbereiches (166;202), sekundärer Hyperparathyreoidismus (erhöhter PTH-Spiegel bei niedrigem Serumkalzium) (99) und Hashimoto-Thyreoiditis (131). Neuste Studie legen nahe, dass niedrige VitD-Serumwerte die Pathogenese des DM Typ 1 bemerkenswert beeinflussen (15).

Ältere Personen und Langzeitpflegebedürftige zählen zu den Personengruppen, die ein hohes Risiko für ein VitD-Defizit haben. VitD spielt eine wichtige Rolle für die neuromuskuläre Koordination. Ältere Menschen mit VitD-Defizit haben ein höheres Risiko zu stürzen oder Frakturen zu erleiden, weshalb eine Substitution dieses Vitamins ratsam ist. Die Dosis wird üblicherweise in Internationaler Einheit (IE) angegeben (1 IE = 0,025 µg Vitamin D). Die tägliche Supplementation von 700-1000 IE VitD führte bei älteren Menschen zu einer Reduktion des Sturzrisikos um 19%. Eine Dosis unter 700 IE VitD pro Tag erzielte keinen Effekt auf das Sturzrisiko (13;41). Eine Supplementation mit 2000-3000 IE/d VitD ermöglicht eine relevante Erhöhung der VitD-Serumspiegel auf klinisch wünschenswerte Serumspiegel (30-50 nmol/l) und normalisieren den PTH-Spiegel (127). Die Referenzwert für die tägliche Supplementation bei fehlender Eigensynthese wurden 2012 von der „Deutschen Gesellschaft für Ernährung“ e.V. modifiziert (Tabelle 8).

Tabelle 8: Empfehlungen für die Supplementation von VitD (58)

Alter	VitD bei fehlender endogener Synthese in µg/d
Säuglinge (0 bis unter 12 Monate)	10
Kinder (1 bis unter 15 Jahre)	20
Jugendliche/Erwachsene (15 bis <65 Jahre)	20
Erwachsene ab 65 Jahre	20
Schwangere/Stillende	20

VitD: Vitamin D (1 µg=40 IE); d: Tag.

Die empfohlene Menge VitD kann zwar theoretisch über die Nahrung gedeckt werden, dies gelingt aber nur Menschen, die große Mengen Fisch (Hering, Sardinen) und Fischfette (z.B. Lebertran) zu sich nehmen. Da die VitD-Aufnahme im Darm über Transporter für fettlösliche Vitamine im Duodenum geschieht, können Darmerkrankungen wie Zöliakie oder chronisch entzündliche Darmerkrankungen einen VitD-Mangel weiter aggravieren.

### 1.2.2 Kalzium

$\text{Ca}^{2+}$  liegt im Körper zu 99% in der Knochenmatrix gespeichert vor. Von dem restlichen 1% sind im Serum 45% des  $\text{Ca}^{2+}$  an Albumin oder Globulin gebunden, 5% liegen komplexgebunden an Anionen vor und 50% sind als freie Ionen vorhanden. Das freie, ionisierte  $\text{Ca}^{2+}$  stellt die biologisch aktive Fraktion dar und wird durch pH-Wert Veränderungen beeinflusst (eine Verschiebung des pH von 0,1 bewirkt eine gegensinnige Verschiebung des ionisierten  $\text{Ca}^{2+}$  von 0,05 mmol/l) (71).

Nahrungsmittel mit einem hohen Gehalt gut verstoffwechselbaren  $\text{Ca}^{2+}$  sind: Milch und Milchprodukte (vor allem Hartkäse), Meeresalgen (1), Gemüse (vor allem Grünkohl, Petersilie, Rucola), Trockenfrüchte, Sojamilch, Vollkornbrot und Ölsaaten.

Im extrazellulären Raum wird der  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegel in eng gefassten Grenzen konstant gehalten, damit Prozesse an (Herz-) Muskel- und Nervenzellen funktionsfähig bleiben. Bei Hyperkalzämie (Serum- $\text{Ca}^{2+}$  >3,5 mmol/l) können Polyurie, Polydipsie, Erbrechen, Exsikkose mit Hyperpyrexie, psychotische Erscheinungen und Somnolenz bis hin zum Koma auftreten. Bei Hypokalzämie (Serum- $\text{Ca}^{2+}$  <2,2 mmol/l) drohen klinische Symptome wie Tetanie, Parästhesien, Pfötchenstellung der Hände, Stimmritzenkrampf und QT-Zeit Verlängerungen im Elektrokardiogramm (71).

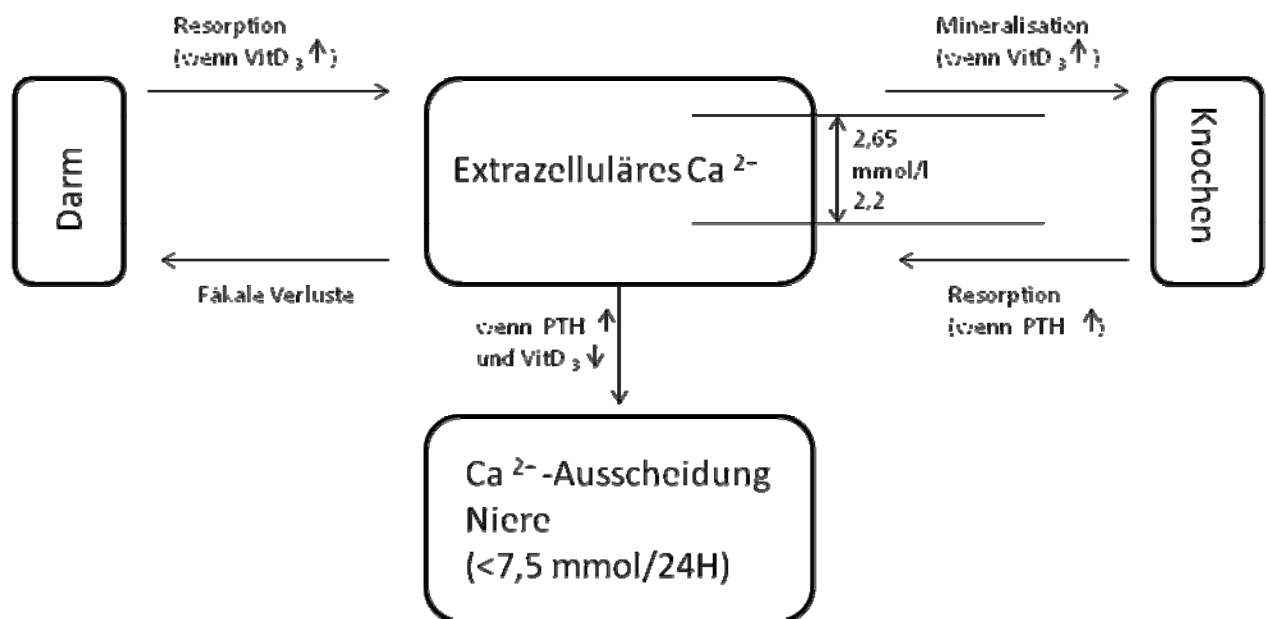


Abbildung 3:  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase (71)

Der Regelkreis der  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase (Abbildung 3) wird durch Hormone und Vitamine in Balance gehalten. Der Regelkreis umfasst die Resorption und Ausscheidung von  $\text{Ca}^{2+}$  im Darm, in der Niere und Mobilisierung bzw. Einbau von  $\text{Ca}^{2+}$  in Knochen. Sinkt z.B. der  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegel im Blut ab, wird aus einer inaktiven Stufe von VitD der aktive Metabolit 1,25-Vitamin- $\text{D}_3$  (Calcitriol) gebildet. Im Zusammenspiel mit PTH aus den Nebenschilddrüsen fördert es die Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}$  aus der Knochenmatrix und erhöht die Aufnahme von  $\text{Ca}^{2+}$  im Darm. Der  $\text{Ca}^{2+}$ -Wert im Blut steigt wieder an und die Bildung von Calcitriol wird gedrosselt. Wird z.B. zu viel PTH im Körper gebildet, kann es zu einem empfindlichen Verlust an  $\text{Ca}^{2+}$  aus der Knochenmatrix und zu einer Abnahme der BMD kommen. Erhöhte PTH-Spiegel findet man, wenn VitD als Vermittler der intestinalen  $\text{Ca}^{2+}$ -Resorption fehlt, bei malignen Prozessen der (Neben-) Schilddrüse und während der Laktation (71). Gko hemmen die  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme aus dem Darm und fördern die  $\text{Ca}^{2+}$ -Ausscheidung über die Nieren, was auch den PTH-Spiegel erhöhen kann (Abbildung 3). Hormonelle Gegenspieler des PTH sind Calcitonin und Östrogen, die den Einbau von  $\text{Ca}^{2+}$  in die Knochenmatrix fördern.

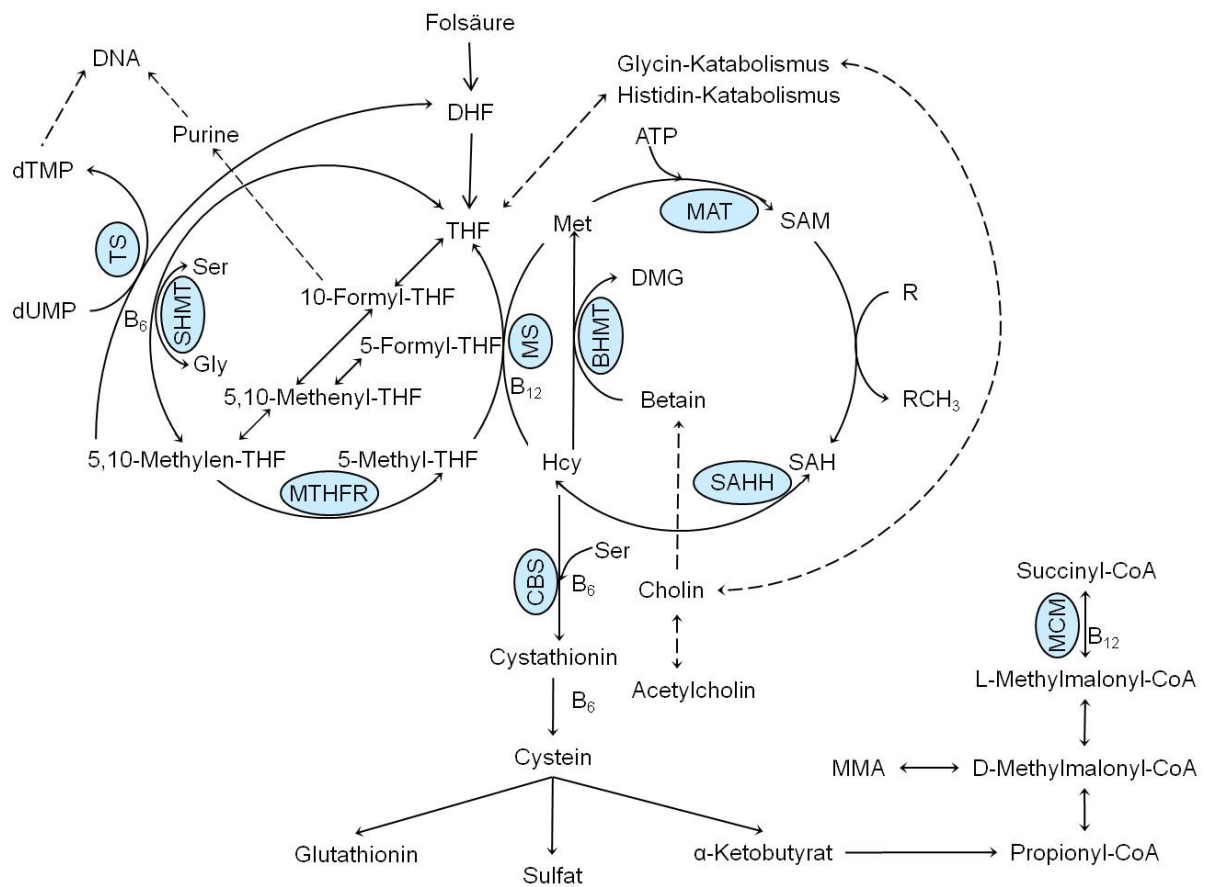
### **1.2.3 Weitere ernährungsbedingte Faktoren mit klinischer Relevanz für den Knochenstoffwechsel**

In den letzten Jahren richtete sich der Fokus der Forschung auf weitere ernährungsbedingte Faktoren mit klinischer Relevanz für den Knochenstoffwechsel. Hier rückten vor allem Gesamthomocystein (tHcy), B-Vitamine und ihre Metabolite in das Licht der Aufmerksamkeit. Bereits vor 50 Jahren wurde von McKusick et al. ein Zusammenhang zwischen pathologischen Knochenveränderungen und Hyperhomocysteinurie bei Patienten vermutet. tHcy wurde verdächtigt, den Stoffwechsel saurer Mucopolysaccharide zu beeinflussen, der in der Kollagensynthese zum Tragen kommt. Eine weitere Hypothese bestand in der Annahme, dass tHcy das Kollagen-cross-linking stört ([142](#)). Aktuelle Daten, basierend auf großen Populationen, beobachteten essentielle Zunahmen von Frakturen bei steigenden tHcy-Werten ([143;185;207](#)). Die placebo-kontrollierte Studie von Sato et al. untermauerte die klinische Relevanz von Folat, Vitamin B<sub>12</sub> (VitB<sub>12</sub>) und Vitamin B<sub>6</sub> (VitB<sub>6</sub>) für die Knochengesundheit. Die Frakturrate der supplementierten Patienten erwies sich als enorm reduziert ([185](#)). Eine Studie an 96 Vegetariern zeigte einen Zusammenhang zwischen niedrigem VitB<sub>12</sub>-Status und gesteigertem Knochenumsatz unabhängig vom VitD-Status ([84](#)). Folat, VitB<sub>12</sub> und VitB<sub>6</sub> spielen eine tragende Rolle bei der Regulation der zirkulierenden tHcy-Werte. Ein Mangel an diesen Vitaminen übt also, vermutlich über tHcy, eine negative Wirkung auf den Knochen aus.

### **1.2.4 Homocystein**

Hcy ist eine nicht proteinbildende schwefelhaltige Aminosäure und ist mit einem Molekulargewicht von 135 Dalton ein eher kleines Molekül. Hcy wird nicht über die Nahrung zugeführt, sondern tritt nur als Intermediärprodukt im Stoffwechsel von Methionin (Meth) auf (Abbildung 4) ([148](#)).

#### 1.2.4.1 Homocysteinemetabolismus



### Abbildung 4: Homocystein-Metabolismus

BHMT: Betain-Homocystein-Methyltransferase; CBS: Cystathionin- $\beta$ -synthase; DHF: Dihydrofolat; DMG: Dimethylglycin; dTMP: Desoxythymidin-Monophosphat; dUMP: Desoxyuridine-Monophosphat; Gly: Glycin; Hcy: Homocystein; MS: Methionin-Synthase; MAT: Methionin-Adenosyltransferase; MCM: L-Methylmalonyl-CoA-Mutase; Met: Methionin; MMA: Methylmalonsäure; MTHFR: Methylen-Tetrahydrofolat-Reduktase; SAH: S-Adenosyl-Homocystein; SAHH: S-Adenosyl-Homocystein-Hydrolase; SAM: S-Adenosyl-Methionine; Ser: Serin; SHMT: Serin-Hydroxy-Methyltransferase; THF: Tetrahydrofolat; TS: Thymidylat-Synthase.

Aus Hcy kann Meth durch einen Remethylierungsweg zurückgewonnen werden (Salvage-Pathway). Beim Abbau von Hcy durch Kondensation von Hcy mit Serin (Transsulfurierungsweg) entsteht Cystathionin als Nebenprodukt (Abbildung 4).

#### 1.2.4.2 S-Adenosyl-Methionin und S-Adenosyl-Homocystein

Meth aus der Nahrung wird unter Verbrauch von Adenosintri-phosphat (ATP) aktiviert. Dabei entsteht energiereiches S-Adenosyl-Methionin (SAM). SAM ist wichtigster Methylgruppen-donator zellulärer Reaktionen in lebenden Organismen. Zu den wichtigsten Abnehmern der Methylgruppen von SAM gehören die Kreatin-Synthese (liefert bis zu 75% des im Organismus anfallenden Hcy) und die Methylierung von Nukleinsäuren (Cytosin) der DNA. SAM überträgt seine Methylgruppe leicht (Transmethylierung) und wird zu S-Adenosyl-Homocystein (SAH) demethyliert. SAH stellt einen effektiven kompetitiven Methyltransferaseinhibitor dar. Unter physiologischen Bedingungen wird SAH, katalysiert durch SAH-Hydrolase, reversibel zu Hcy hydrolysiert (Abbildung 4). Der SAM/SAH-Quotient ist ein Indikator für die zelluläre Methylierungskapazität und wird als „Methylierungs-Index“ bezeichnet. SAM reguliert die Methylen-Tetrahydrofolat-Reduktase-(MTHFR)-Aktivität, indem es an das aktive Zentrum des Enzyms bindet (124). SAH kann diese Hemmung des Enzyms rückgängig machen (52). SAM aktiviert die Cystathionin- $\beta$ -Synthase (CBS) (189). Niedrige SAM-Serumspiegel beeinträchtigen die Produktion von Tetrahydrofolat (THF) nicht, hohe SAM-Serumspiegel hingegen verschieben die Gewichtung der Reaktionen in Richtung Transsulfurierung von Hcy zu Cys (49). Referenzwerte sind in Tabelle 9 dargestellt.

Tabelle 9: Referenzwerte für SAM und SAH (116)

SAM	Plasma	74,4-96,6 nmol/l
SAH	Plasma	8,3-18,3 nmol/l

SAM: S-Adenosyl-Methionin; SAH: S-Adenosyl-Homocystein

Hcy ist stark zelltoxisch und wird in seiner intrazellulären Konzentration niedrig gehalten. Neben dem Export aus der Zelle kann Hcy durch Remethylierung zu Meth aufgebaut oder, wie oben schon erwähnt, durch Transsulfurierung abgebaut werden (144). Bei der Remethylierung wird ein von der 5-Methyl-THF bereitgestellte Methylgruppe durch das VitB<sub>12</sub> abhängige Enzym Methionin-Synthase (MS) auf Hcy übertragen. Der Co-Faktor VitB<sub>12</sub> wird hier in seiner aktivierten Form (Methylcobalamin) benötigt. 5-Methyl-THF wird dann zu THF umgewandelt. Durch die Serinhydroxymethyltransferase, die Serin zu Glycin umwandelt, wird THF zu 5,10-Methylen-THF aufgebaut. MTHFR reduziert 5,10-Methylen-THF zu 5-Methyl-THF, welches nun wieder für den Remethylierungsweg zur Verfügung steht (Abbildung 4) (144). Dieser Schritt wird von SAM gehemmt (123).

Durch Transsulfurierung kann Hcy abgebaut werden. Die Transsulfurierung findet im Vergleich mit der Remethylierung jedoch nicht ubiquitär, sondern nur in den Nieren, dem

Dünndarm, der Leber und dem Pankreas statt (51). Cys wird bei diesem Vorgang durch die CBS aus Serin und Hcy gebildet. Die CBS benötigt Pyridoxalphosphat (PLP) als Co-Enzym. SAM verstärkt diese Transsulfurierung (50;188). Durch die Abspaltung von  $\alpha$ -Ketobutyrat wird Cys zu Cystein. Dies geschieht durch die  $\gamma$ -Cystathionase, die auch VitB<sub>6</sub> als Coenzym benötigt (Abbildung 4). Greifen diese Mechanismen nicht oder nicht mehr, entsteht eine Hyperhomocysteinämie (HHcy). In den letzten Jahren wurde umfassend über tHcy-Konzentrationen und die Gründe für HHcy diskutiert (Tabelle 10).

Tabelle 10: tHcy-Konzentrationen und Wirkung (83)

tHcy	Konzentrationsbereich	indikativ für
Normales tHcy	<10-12 $\mu\text{mol/l}$	--
Moderate HHcy	12-30 $\mu\text{mol/l}$	B-Vitaminmangel; MTHFR-Mutation; renale Dysfunktion
Intermediäre HHcy	>30-100 $\mu\text{mol/l}$	Heterozygote Enzymmutation (z.B. CBS); schwerer Vitaminmangel
Schwere HHcy	>100 $\mu\text{mol/l}$	Homozygote Enzymmutation (z.B. CBS, MS)

tHcy: Gesamthomocystein; HHcy: Hyperhomocysteinämie; MTHFR: Methylen-Tetrahydrofolat-Reduktase; CBS: Cystathionin- $\beta$ -Synthase; MS: Methionin-Synthase

Ein bis zwei Prozent des tHcy zirkulieren als freies Hcy im Blut, 70-90% des Hcy ist an Proteine gebunden, 5-10% liegen als Homocystin vor und 5-10% als Cystein-Homocystein. Zur Messung des tHcy im Blut ist es deshalb notwendig, die Proteinbindungen des Hcy zu lösen und in einem Reduktionsschritt Homocystin zu Hcy zu reduzieren. Die Messung der tHcy-Konzentration im Serum sollte bei bestimmten Risikogruppen zum Standard gehören.

Die Zielgruppen für eine tHcy-Bestimmung sind folgende: Manifeste Gefäßerkrankungen wie Myokardinfarkt, koronare Herzerkrankung, zerebraler Insult, periphere arterielle Verschlusskrankheit, weiterhin Risikogruppen für Herz-Kreislaufferkrankungen (arterieller Hypertonus, Diabetiker, Raucher, Patienten mit Niereninsuffizienz oder Adipositas), andere Risikogruppen (Demenzranke, Schwangere mit Präeklampsie oder HELLP-Syndrom, Rheumatiker, Menschen mit OSP) und schließlich Risikogruppen für Vitaminmangel (ältere Menschen, Vegetarier, Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen oder Nierenerkrankungen) (6;85;86). Neben der, im Alter zunehmenden, Nierenfunktionseinschränkung und den eher selten vorkommenden Enzym-Mutationen, ist ein Vitaminmangel die mit Abstand bedeutendste Ursache einer HHcy. Der häufigste Vitaminmangel in Europa ist der Folatmangel. Der Folatmangel wird begünstigt durch einen Mangel an frischem Obst und Gemüse und die Verarbeitungsmethoden von Getreideprodukten (83). Die effektiv sen-



kende Wirkung verschiedener Folsäuredosierungen wurde über ein halbes Jahr hinweg untersucht (200). Das Ausmaß der Senkung hing jeweils von den Ausgangskonzentrationen von tHcy im Serum ab. Bei Probanden mit hohen Ausgangswerten, wurde der tHcy-Spiegel besonders effektiv gesenkt: bei einer Supplementation von 0,8 mg Folsäure pro Tag um fast 30%. Bei niedrigeren Basalwerten für tHcy fällt die Senkung durch Folsäuresupplementation geringer aus. So kann mit täglichen Folsäuregaben von 0,2-5 mg eine Senkung von 16-39% erzielt werden (200).

### 1.2.5 Folat

Das Grundskelett der Folatformen (Pteroylmonoglutaminsäurederivate) bilden: L-Glutamat (mit Glutaminresten), Aminobenzoesäure und ein Pteridinrest. Von den natürlich vorkommenden Folaten (reduzierte Form) kann die künstlich hergestellte Folsäure (oxidierte Form) unterschieden werden.

#### 1.2.5.1 Lebensmittel als Folatquellen

Metabolisch aktive Folate findet man in vielen Lebensmitteln, wie z.B.: Leber, Gemüse (vor allem in Tomaten aber auch in Salat, Spinat, Spargel, Gurken, u.a.) oder Getreide. Bei der Lagerung und Zubereitung der Nahrungsmittel sollte beachtet werden, dass Folate hitzeempfindlich und wasserlöslich sind. Natürliche Folate weisen eine 30-80% geringere Bioverfügbarkeit auf als Folsäure. Aufgrund einer seit 1998 bestehenden Fortifikation von Getreideprodukten in den USA unterscheiden sich die Mengen der über die Nahrung aufgenommenen Folsäure weltweit stark. Rund 50 Länder folgten seitdem diesem Beispiel der vorgeschriebenen Fortifikation von Grundnahrungsmitteln. In Deutschland wird die verpflichtende Fortifikation von Grundnahrungsmitteln noch kontrovers diskutiert (89).

Die von der Deutschen Gesellschaft für Ernährung e.V. empfohlene tägliche Zufuhr an Folaten liegt (nach aktuellen Änderungen) bei 300 µg (42). In Mitteleuropa kann die derzeit empfohlene tägliche Folatzufuhr von einem Großteil der Bevölkerung nicht über die Nahrung gedeckt werden (Tabelle 11).

Tabelle 11: Über Nahrung aufgenommene Folate bei Mitteleuropäern (tatsächliche versus empfohlene Menge) (38;53)

		aus Nahrung/d	empfohlen/d
Folate	M	168-214 µg	300 µg
	F nicht schwanger	197-235 µg	300 µg

M: Männer; F: Frauen; d: Tag

#### 1.2.5.2 Resorption der Folate im Darm und Aufnahme in den Blutkreislauf

Die überwiegend in der Nahrung vorliegenden Polyglutamylfolate werden vor der Resorption im Bürstensaum der Mukosazellen des Dünndarms zu Monoglutamat hydrolysiert. Für den aktiven Transport durch die Zellmembran ist ein pH-Wert von 6 optimal. Wichtige Transporter für Folate im Darm sind der Reduced-folate-carrier-1 (RFC1) und der Protonengekoppelte Folattransporter (PCFT/HCP1). Bis zu 30% der Folate diffundieren passiv in die Darmmukosazellen. Nach Transport durch den portalen Kreislauf werden die Folate in der Leber methyliert. Im Blut findet sich hauptsächlich 5-Methyl-THF, das an Albumin,  $\alpha$ -2-Makroglobulin und Transferrin gebunden transportiert wird. Über einen membranständigen Carrier wird während der Erythropoese 5-Methyl-THF zur langfristigen Speicherung in den Erythrozyten aufgenommen (83).

#### 1.2.5.3 Speicherformen der Folate im Körper

Man unterscheidet den Langzeitspeicher, der sich in den Erythrozyten befindet, vom aktuellen Folatspiegel im Serum. Der Langzeitspeicher reagiert auf kurzzeitige folatarme Diäten unempfindlich, da die Folate in den Erythrozyten bis zum Absterben (circa 120 Tage) verbleiben. Es besteht ein Folatmangel, wenn die Folatkonzentration im Serum  $<3,5 \mu\text{g/l}$  und in den Erythrozyten  $<250 \mu\text{g/l}$  beträgt (10). Das Folat im Serum ist nur ein kurzfristiger Marker, der von der Nahrungsaufnahme der letzten 2-3 Wochen beeinflusst wird.

#### 1.2.5.4 Klinische Symptome des Folatmangels

Bei einem Folatdefizit sinkt zuerst die Ausscheidung von Folaten über den Urin, gefolgt von einer Abnahme der Serumspiegel. Ein Abfall der Folatkonzentrationen in den Erythrozyten

erfolgt erst 3-4 Wochen später. Eine Übersegmentierung der neutrophilen Granulozyten kann nach 10-12 Wochen beobachtet werden, gefolgt von Thrombopenie, Leukopenie und makrozytärer Anämie. Die Diagnose einer klinisch bedeutsamen megaloblastären Anämie ist selten geworden. Sowohl Folatmangel als auch VitB<sub>12</sub>-Mangel rufen das klinische Bild einer megaloblastären Anämie hervor. Vor einer Folsäuresupplementation sollte wegen der Gefahr der funikulären Myelose immer ein VitB<sub>12</sub>-Mangel abgeklärt werden (83). Ein Folatmangel der schwangeren Frau kann Neuralrohrdefekte beim Ungeborenen begünstigen. Die Deutsche Gesellschaft für Ernährung hat ihre Empfehlungen für die tägliche Zufuhr von Folat durch die Nahrung im Januar 2013 modifiziert (Tabelle 12).

Tabelle 12: Empfehlung der Deutschen Gesellschaft für Ernährung e.V. für die tägliche Folatzufuhr (42)

Alter	Folat µg/d
Säuglinge (0-12 Monate)	60-85
Kinder (1-15 Jahre)	120-300
Jugendliche/Erwachsene (15->65 Jahre)	300
Schwangere	550
Stillende	450

d: Tag

## 1.2.6 Vitamin B<sub>12</sub>

Der Mensch benötigt VitB<sub>12</sub> als Koenzym (Abbildung 4) für die MS (Remethylierung von Hcy zu Meth) und die L-Methylmalonyl-CoA-Mutase (Isomerisierung von Methylmalonyl-CoA zu Succinyl-CoA) (83).

### 1.2.6.1 Lebensmittel als Vitamin- B<sub>12</sub>-Quellen

Wichtige VitB<sub>12</sub>-Quellen für den Menschen sind: Leber, Fleisch, Eier, Milchprodukte und Fisch (83). Die enterale Synthese von VitB<sub>12</sub> durch Mikroorganismen stellt für den Menschen keine bedarfsdeckende Quelle dar. Die Deutsche Gesellschaft für Ernährung empfiehlt für Jugendliche und Erwachsene eine tägliche Zufuhr von 3 µg VitB<sub>12</sub>.

#### *1.2.6.2 Resorption von Vitamin B<sub>12</sub> im Darm*

Das Cobalamin (Cbl) liegt in der Nahrung an Proteine gebunden vor und wird im Magen und Dünndarm zunächst durch Pepsin vermittelte Proteolyse freigesetzt. Nach Bindung des Cbl an Transcobalamin (TC) und Spaltung durch Trypsin kann Cbl an den Intrinsischen Faktor (IF) binden. Der IF ist ein Glykoprotein, dass von den Belegzellen der Magenmukosa gebildet wird (122). 60-70% des Nahrungs-Cbl werden durch ein funktionsfähiges intrinsisches System aufgenommen, lediglich 1% diffundieren passiv. Der Cbl/IF Komplex bindet im unteren Ileum an einen spezifischen Rezeptor und wird durch Endozytose in Enterozyten aufgenommen. Für die Bindung des Cbl/IF Komplexes wird am Rezeptor freies Ca<sup>2+</sup> benötigt (122). Fehlt freies Ca<sup>2+</sup> (z.B. bei Metformintherapie, Pankreaserkrankungen) ist die Komplexbindung am Rezeptor gestört (92). Die Störung ist reversibel und kann durch Ca<sup>2+</sup>-Gabe aufgehoben werden. Intrazellulär wird das Cbl nach Trennung vom IF freigesetzt und an TC gebunden. Dieser Komplex aus Cbl und TC wird Holotranscobalamin (holoTC) genannt und stellt den aktiven Metaboliten von Cbl dar.

#### *1.2.6.3 Bedeutung des Holotranscobalamin*

In Bezug auf das gesamte zirkulierende Cbl bildet holoTC nur einen Anteil von 6-25%, stellt aber den biologisch wichtigeren Anteil dar, weil nur diese Form von Zellen aufgenommen wird. Der größere Anteil des Cbl ist an eine andere Form des TC gebunden, dessen Funktion noch nicht bekannt ist und dem heutzutage kaum mehr Aufmerksamkeit geschenkt wird. HoloTC hat eine Plasma-Halbwertszeit von 2 Stunden. Ein Absinken des Plasma-holoTC-Spiegels gilt momentan als ein frühes Indiz für eine Resorptionsstörung.

#### *1.2.6.4 Klinische Symptome des Vitamin-B<sub>12</sub>-Mangels*

Neben Vegetariern (besonders Ovo-Lacto-Vegetarier) weisen vor allem Senioren und Patienten mit Nierenerkrankungen eine hohe Prävalenz für VitB<sub>12</sub>-Mängel auf (91). Durch einen VitB<sub>12</sub>-Mangel verursachte metabolische Störungen sind primär HHcy und Hypomethylierung. Durch einen VitB<sub>12</sub>-Mangel verursachte klinische Störungen sind die megaloblastäre Anämie (Makrozytose, erhöhtes mittleres korpuskuläres Volumen (MCV), erniedrigtes Hämoglobin, Übersegmentierung der Neutrophilen) und neuropsychiatrische Erkrankungen (88). Bei Verdacht auf VitB<sub>12</sub>-Mangel sollten die Werte für Gesamt-VitB<sub>12</sub>, Methylmalonsäure (MMA) und

holoTC bestimmt werden, da ein erniedrigter holoTC- und ein erhöhter MMA-Spiegel sensitive (aber nicht völlig spezifische) Marker für einen funktionellen VitB<sub>12</sub>-Mangel sind (88;91). Die Referenzwerte liegen für MMA bei >271 nmol/l und für holoTC bei 35 pmol/l (jeweils im Serum). Der MMA-Spiegel steigt, wenn der Abbau von D-Methylmalonyl-CoA über L-Methylmalonyl-CoA zu Succinyl-CoA mit Hilfe der VitB<sub>12</sub> abhängigen Transferase aufgrund einer mangelhaften Versorgung mit VitB<sub>12</sub> gehemmt wird. In diesem Fall wird, durch den damit einhergehenden Rückstau von L-Methylmalonyl-CoA, der alternative Abbauweg von D-Methylmalonyl-CoA zu MMA begünstigt.

Für die Diagnose eines klinisch manifesten Cbl-Mangels ist die Messung von holoTC ausreichend und zufriedenstellend, für die Erkennung eines subklinischen Cbl-Mangels liefert die Messung jedoch noch keine zufriedenstellend reliablen Daten. Weitere Untersuchungen sind hier nötig (26).

### 1.2.7 Vitamin B<sub>6</sub>

Unter VitB<sub>6</sub> werden die Substanzen Pyridoxin, Pyridoxal und Pyridoxamin zusammengefasst. Die metabolisch aktive Form des VitB<sub>6</sub> ist PLP. Die *de novo* Synthese von VitB<sub>6</sub> findet in Pflanzen, Bakterien und Pilzen statt. Für den Menschen ist das wasserlösliche VitB<sub>6</sub> ein essentielles Vitamin und muss mit der Nahrung zugeführt werden.

Als VitB<sub>6</sub>-Quelle für den Menschen dienen vor allem tierisches Eiweiß (Innereien, Muskelfleisch, Makrelen, Sardinen), pflanzliche Kost (Kartoffeln, Getreide, Gemüse) und Milchprodukte (83). Je nach Zubereitungsart kann sich der Gehalt an VitB<sub>6</sub> im Vergleich zum Rohprodukt erheblich reduzieren. Beim Braten oder Kochen tierischer Produkte liegt der Verlust von VitB<sub>6</sub> bei 30-40%, bei der Zubereitung pflanzlicher Kost ist der Verlust geringer (128).

Im Dünndarm, überwiegend im Jejunum, wird das VitB<sub>6</sub> über einen passiven, nicht sättigbaren, Carrier-vermittelten Prozess von den intestinalen Epithelzellen absorbiert (180). Nach der Einschleusung in die Mukosazelle des Darms erfolgt dann eine Rephosphorylierung zu PLP durch Pyridoxalkinase. Kurz vor der Ausschleusung aus der Zelle in den Blutkreislauf erfolgt erneut eine Dephosphorylierung. Im Colon wird das von den Darmbakterien produzierte VitB<sub>6</sub> absorbiert. Dieser, durch einen Carrier vermittelter, fein regulierbarer Transport spielt jedoch aufgrund der sehr geringen aufgenommenen Mengen an VitB<sub>6</sub> keine Rolle (181). Im Blut liegt das VitB<sub>6</sub> zu etwa 60% als PLP, zu 15% als Pyridoxin und zu 14% als Pyridoxal vor (128). Als Schutz vor Hydrolyse und zur Versorgung anderer Gewebe liegen die Derivate, überwiegend an der Stelle Lys 190, an Albumin gebunden vor (18). In Erythrozyten ist die Konzentration des, hier an Hämoglobin gebundenen, PLP ca. 4-5 Mal höher als

im Plasma (128). PLP ist Kofaktor für über 100 Enzyme, die zu 50% bei Reaktionen des Aminosäurenstoffwechsels eine Rolle spielen. Insgesamt lassen sich drei Typen enzymatischer Reaktionen am  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Kohlenstoffatom der Aminosäure definieren. Zu den PLP-abhängige Enzymen des Aminosäurenstoffwechsels gehören z.B. die Aminotransferasen, L-Aminosäure-Decarboxylasen und die Cystathionin- $\beta$ -Synthase (Abbildung 4). Zu den klassischen Symptomen eines VitB<sub>6</sub>-Mangels gehören periphere Neuropathie, Erbrechen, Depressionen und Haut- und Schleimhautveränderungen (83).

### **1.3 Fragestellung und Ziel der Studie**

In der letzten Zeit hat sich ein erhöhter Spiegel von Plasma-tHcy als unabhängiger Risikofaktor für OSP und osteoporotische Frakturen herauskristallisiert (80;143;207). Beobachtungsstudien zeigten eine 2-4 fache Zunahme des Frakturrisikos bei erhöhten tHcy-Konzentrationen (60;143;207). Zusätzlich zeigten einige Autoren einen Zusammenhang zwischen hohem tHcy und steigenden Knochenresorptionsmarkern (43;57;73). Im Tiermodell führte die gewebespezifische Akkumulation von tHcy im Knochen zu einer verringerten Methylierungskapazität der Knochenzellen (76).

Die häufigste Ursache für erhöhte tHcy-Spiegel bei Erwachsenen ist ein Mangel an Folat, VitB<sub>12</sub> und VitB<sub>6</sub>. Autoren haben gezeigt, dass durch Vitaminmangel bedingte HHcy, die Aktivität von Osteoblasten *in vitro* nicht beeinträchtigt wird (79). Die Aktivität von Osteoklasten wird durch B-Vitaminmangel bedingte HHcy jedoch signifikant gesteigert (72). Einen beeindruckenden Beweis für die klinische Relevanz der B-Vitamine lieferte die klinische Studie von Sato et al., die über zwei Jahre doppelblind 600 Patienten mit B-Vitaminen behandelte und eine Reduktion der Schenkelhalsfrakturrate um 75% beobachteten (185).

In unserer Studie wurden Probanden, zusätzlich zu einer Basistherapie mit Ca<sup>2+</sup> und VitD, über 12 Monate mit B-Vitaminen supplementiert. Unsere Arbeitshypothese lautete, dass die Supplementation von B-Vitaminen einen zusätzlichen positiven Effekt auf den Knochenstoffwechsel ausübt, verglichen mit einer ausschließlichen Einnahme von VitD und Ca<sup>2+</sup>. Dafür haben wir zu Studienbeginn (teilweise nach 6 Monaten) und nach 12 Monaten die Werte für VitD, B-Vitamine, tHcy und verschiedene Knochenmarker des Knochenauf- und abbaus bestimmt.

## 2. Material und Methodik

### 2.1 Studiendesign

Ziel der Studie war die Supplementation älterer Personen (>65 Jahre) mit VitB<sub>6</sub>, VitB<sub>12</sub> und Folsäure oder Placebo zusätzlich zur Basistherapie mit Ca<sup>2+</sup> und VitD über 1 Jahr in einer doppelblinden, randomisierten Studie (KnoViB-Studie von Knochengesundheit und Vitamin B) (Abbildung 5).

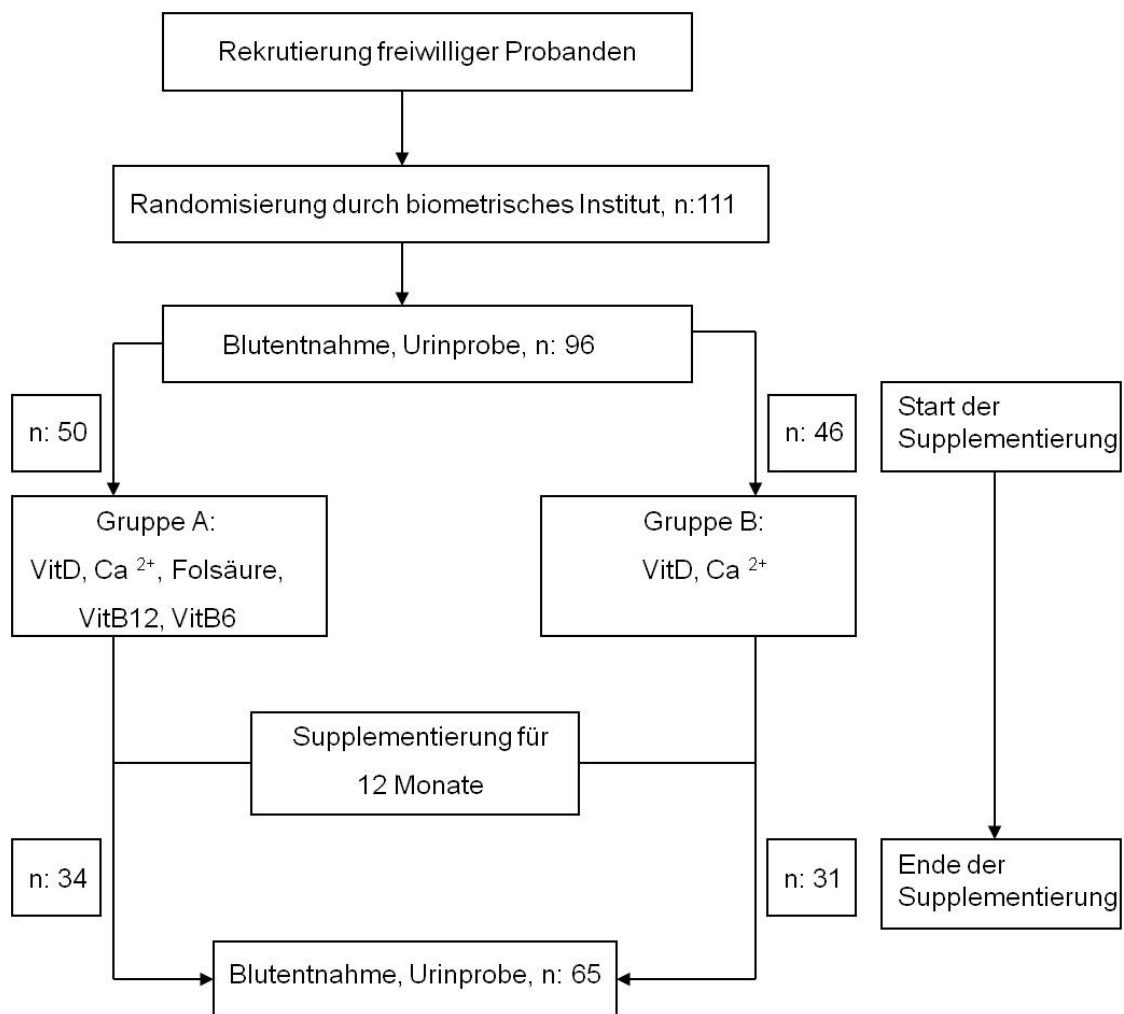


Abbildung 5: KnoViB-Studienplan



## **2.2 Probandenrekrutierung, Verlauf**

Die Probanden wurden im Zeitraum zwischen August 2009 und Juni 2010 aus verschiedenen Kollektiven rekrutiert:

- 13 Probanden aus einer geriatrischen Klinik in St. Ingbert
- 7 Teilnehmer einer Chors
- 49 Teilnehmer einer Herzsportgruppe
- 22 Bewohner des Altenheims „Pro Seniore“
- 20 Teilnehmer über eine Anzeige im Homburger „Wochenspiegel“

Alle Teilnehmer wurden in Zusammenarbeit mit dem Institut für Biometrie randomisiert und der Gruppe A oder B zugeordnet (siehe Randomisierungsbogen im Anhang). Sieben Teilnehmer wurden nicht randomisiert, um eine Verwechslung der Tabletten im gleichen Haushalt zu vermeiden. Mit jedem Teilnehmer wurde vor Beginn der Studienteilnahme ein standardisiertes Interview auf der Basis eines Fragebogens geführt (siehe Anhang). Die Teilnehmer erhielten sowohl ein Informationsblatt für die eigenen Unterlagen, als auch ein Informationsschreiben für den Hausarzt (siehe Anhang). Entsprechend seiner Gruppenzugehörigkeit erhielt jeder Teilnehmer zu Beginn seiner Studienteilnahme einen Vorrat an Vitamintabletten für 4 Monate. In jedem Tertial wurde mindestens ein Mal telefonisch Kontakt zum Teilnehmer aufgenommen. In dem Telefonat wurde nach dem Befinden, nach neu aufgetretenen Erkrankungen, nach Krankenhausaufenthalten, nach neu verschriebenen Medikamenten und der regelmäßigen Einnahme der Tabletten gefragt (siehe Telefonprotokoll im Anhang). Nach Ablauf der 4 Monate wurden wieder neue Kapseln an die Teilnehmer verteilt und im folgenden Tertial erfolgte wieder ein Anruf zur Sicherstellung der Compliance der Teilnehmer oder gegebenenfalls zur Sammlung neuer Informationen, die den Studienverlauf beeinflussen.

### 2.2.1 Vitamintabletten

Die Firma „Synervit“ stellte die Vitaminpräparate für die Gruppen A und B zur Verfügung. Die Vitamine und das  $\text{Ca}^{2+}$ -Karbonat wurden auf drei Kapseln verteilt (Tabelle 13). Durch die Verteilung der Einnahme über den Tag wurde eine gleichmäßige Aufnahme z.B. des  $\text{Ca}^{2+}$ -Karbonats im Darm gewährleistet.

Tabelle 13: Einnahmeschema und Zusammensetzung der Kapseln der Gruppen A und B

Kapseleinnahme	Gruppe A	Gruppe B
morgens (grüne Kapsel)	160 IE VitD <sub>3</sub> 500 µg Folsäure 500 µg VitB <sub>12</sub> 50 mg VitB <sub>6</sub>	160 IE VitD <sub>3</sub>
mittags (weiße Kapsel)	228 mg $\text{Ca}^{2+}$	228 mg $\text{Ca}^{2+}$
abends (braune Kapsel)	1040 IE VitD <sub>3</sub> 228 mg $\text{Ca}^{2+}$	1040 IE VitD <sub>3</sub> 228 mg $\text{Ca}^{2+}$
Gesamt	1200 IE VitD <sub>3</sub> 456 mg $\text{Ca}^{2+}$ 500 µg Folsäure 500 µg VitB <sub>12</sub> 50 mg VitB <sub>6</sub>	1200 IE VitD <sub>3</sub> 456 mg $\text{Ca}^{2+}$

$\text{Ca}^{2+}$ : Kalzium; VitD<sub>3</sub>: aktiver Metabolit des VitD; VitB<sub>12</sub>: Vitamin B<sub>12</sub>; VitB<sub>6</sub>: Vitamin B<sub>6</sub>

### **2.2.2 Ein- und Ausschlusskriterien für Probanden**

Einschlusskriterium war ein Alter >54 Jahre und die Bereitschaft, über ein Jahr hinweg zuverlässig die Studienmedikamente einzunehmen. Klinische Ausschlusskriterien waren: kürzer als ein Jahr zurück liegende periphere Frakturen, die Notwendigkeit einer spezifischen osteologischen Therapie, Kontraindikationen für eine Therapie mit  $\text{Ca}^{2+}$  und/oder VitD, Dauertherapie mit Gko, isolierter VitB<sub>12</sub> oder Folsäuremangel, aktuelle Krebserkrankung, Antifolatbehandlung (MTX), Ileumresektion, Demenz oder andere Erkrankung mit fehlender Einwilligungsfähigkeit. Von laborchemischen Parametern ausgehend wurden Patienten ausgeschlossen, die eine akute Entzündung aufwiesen (CRP >10 mg/l), niereninsuffizient waren (Kreatinin >2  $\mu\text{mol/l}$ ; GFR <30 ml nach Cockcroft-Gault), oder bereits eine Vitamin B-Supplementierung erhielten.

### **2.2.3 Materialgewinnung, Datenerhebung**

Es wurde allen Probanden Nüchternblut entnommen und eine Probe frischer Morgenurin (Mittelstrahl) gesammelt (Tabelle 14). Die Blutentnahmen erfolgten jeweils terminiert im Zentrallabor, bei den Teilnehmern zuhause oder im Altersheim. Bei der Blutentnahme wurden folgende Röhrchen gewonnen (Monovetten® der Fa. Sarstedt):

- Monovette mit Lithium-Heparin
- Monovette mit Ethylen-diamin-tetra-essigsäure (EDTA)
- trockene Monovette

Tabelle 14: Zeitpunkte der Materialgewinnung und gemessene Marker

Blutentnahme	Urinprobe	gemessene Marker
Studienbeginn	+	Hämoglobin, Hämatokrit, Erythrozyten, Leukozyten, Thrombozyten, Kreatinin, Glukose, Albumin, ALAT, CRP, Ferritin, Cholesterin, HDL-Cholesterin, LDL-Cholesterin, Triglyceride, holoTC, tHcy, SAM, SAH, MMA, VitB <sub>12</sub> , Folat, VitD, PTH, BAP, OC, TRAP5b, SCL, DPD
6 Monate	+	Hämoglobin, Hämatokrit, Erythrozyten, Leukozyten, Thrombozyten, Kreatinin, Glukose, Albumin, ALAT, CRP, Ferritin, Cholesterin, HDL-Cholesterin, LDL-Cholesterin, Triglyceride, holoTC, tHcy, SAM, SAH, MMA, VitB <sub>12</sub> , Folat, PTH, BAP, OC, TRAP5b, SCL, DPD
12 Monate	+	Hämoglobin, Hämatokrit, Erythrozyten, Leukozyten, Thrombozyten, Kreatinin, Glukose, Albumin, ALAT, CRP, Ferritin, Cholesterin, HDL-Cholesterin, LDL-Cholesterin, Triglyceride, holoTC, tHcy, SAM, SAH, MMA, VitB <sub>12</sub> , Folat, VitD, PTH, BAP, OC, TRAP5b, SCL, DPD

ALAT: Aminotransferase, CRP: C-reaktives-Protein, HDL: High-density-lipoprotein, LDL: Low-density-lipoprotein, holoTC: Holotranscobalamin, tHcy: Gesamthomocystein, SAM: S-Adenosyl-Methionin; SAH: S-Adenosyl-Homocystein; SAM/SAH-Quotient: Methylierungsindex; MMA: Methylmalonsäure; VitB<sub>12</sub>: Vitamin B<sub>12</sub>; VitD: 25-Hydroxy-Vitamin D

## 2.2.4 Präanalytik

Lithium-Heparin-Gel, EDTA-Blut und Serum-Gel wurden auf Eis gelagert und innerhalb von 30 Minuten weiterverarbeitet. Aus EDTA-Blut wurde Vollblut aliquotiert (3 x 500 µl). Lithium-Heparin-Gel, EDTA-Blut und Serum-Gel wurden daraufhin abzentrifugiert (2000g/10 min). EDTA-Plasma und ein Röhrchen Serum-Gel-Plasma wurden abgetrennt und aliquotiert. Einer EDTA-Plasma-Probe (500 µl) wurde für die SAH/SAM-Messung 50 µl Essigsäure 1 N zugefügt. Alle Proben wurden anschließend bei -70°C gelagert. Ein Teil Serum-Gel und Lithium-Heparin-Gel wurden zeitnah in die Routinediagnostik überstellt. Der Urin wurde innerhalb von 45 Minuten aliquotiert (4 x 1000 µl).

## **2.3 Laborchemische Methodik**

### **2.3.1 Messung von Metaboliten**

#### *2.3.1.1 Messung von Homocystein, Cystathionin und Methylmalonylsäure*

Bei der Messung von tHcy wird in einem Inkubationsschritt Homocystin zu Hcy reduziert, weshalb schlussendlich tHcy gemessen wird. Die Bestimmung von tHcy, Cys und MMA wurde mit Hilfe der Gaschromatographie und Massenspektrometrie [Gas Chromatography – Massspectrometry (GC/MS)] durchgeführt. Wir haben hierfür die Methode von Stabler et al. (1996) für unsere Zwecke modifiziert. Nach der Herstellung gasförmiger Derivate der Moleküle werden diese Derivate gaschromatographisch aufgetrennt. Die jeweilige Konzentration wird dann massenspektrometrisch gemessen. tHcy und Cys können mit dieser Methode gleichzeitig gemessen werden. In der Probe befinden sich deuterierte Formen von tHcy und Cys bzw. MMA als Interne Standards (IS). Für die Ionisation nutzt diese Methode die Elektronenstoßionisation (EI, Electron Impact). Bei dieser Energieübertragung entstehen Ionen oder Ionenfragmente, die jeweils einem substanzspezifischen Muster folgen. Diese Ionen oder Ionenfragmente werden in einem Analysator aufgetrennt und ein Detektor erfasst die Anzahl. Der Detektor setzt die Anzahl in ein Signal um, das der Gesamt-Ionenzahl einer bestimmten Masse proportional ist. Die Kurve des Massenspektrogramms entspricht dann der Funktion Masse/Ladung. Die Konzentration des zu ermittelnden Stoffs in der Probe wird schlussendlich mit Hilfe der bekannten Konzentration der deuterierten Form in der Probe errechnet.

#### **Geräte und Reagenzien:**

- Gaschromatograph/Massenspektrometer der Firma Agilent Technologies® (Typ 6890N).
- Poly-Prep Chromatography Columns der Firma Bio-Rad®.
- Anionisches Resin der Firma Bio-Rad®.
- Derivatisierung: N-Methyl-Butyldimethylsilyl-Tri-Fluoroacetamid (MBDSTFA) der Firma Machery and Nagel®.
- Reduktionsmittel: 1,4-Dithiotritol ( $C_4H_{10}O_2S_2$ , DTT) der Firma Roth®  
Arbeitskonzentration: 10 mg/ml in 1 N NaOH.
- Acetonitril, Methanol, Essigsäure und Chromatographenwasser (HPLC Grade) der Firma Merck®.
- Concentrator (Typ 5301) der Firma Eppendorf®.

**Interne Standards:**

- Hcy: DL-Homocystin(3,3,3',3',4,4,4',4',D-8) der Firma Cambridge Isotope® Laboratories/Inc., Andover, USA  
Arbeitskonzentration: 110,544 mg/l = 400 µmol/l.
- Cys: DL-(2-amino-2-carboxyethyl)-Homocystin = DL-Cystathionin der Firma CDN-Isotopes®  
Arbeitskonzentration: 1,78 mg/l = 7,86 µmol/l.
- MMA: DL-Methylmalonylsäure der Firma CDN – Isotopes®  
Arbeitskonzentration: 4 mg/l = 33,03 nmol/l.

Zur Vorbereitung der Messung von tHcy/Cys wurde anionisches Resin mit 1N HCl und Methanol vorgewaschen und bei 60°C für 4 Stunden getrocknet, pro Säule 100 mg Resin. 200 µl Serum wurden mit 30 µl DTT (30 mg/1ml 1N NaOH), 30 µl IS Hcy 1:3 und 30 µl IS Cys 1:2 versetzt und bei 42°C 30 Minuten zur Reduktion (Homocystin → Hcy) inkubiert. Vor dem Auftragen der Probe wird die Festphase mit 1 ml Methanol und 3 ml Wasser gespült. Nach dem Auftragen wird die Probe dreimal mit 3 ml Wasser gewaschen, anschließend einmal mit 3 ml Methanol. Die Elution erfolgt mit 1,1 ml 0,4 N Essigsäure/Methanol-Mischung. Getrocknet werden die Proben für etwa 3 Stunden bei 60°C im Concentrator. Den getrockneten Proben wurden 30 µl Acetonitril und MBDSTFA im Verhältnis 2:1 hinzugefügt und für fünf Minuten bei 440 Watt in die Mikrowelle gestellt. Danach konnte das GC/MS-Gerät beladen werden. Autosampler, Chromatograph und Massenspektrometer führen die Analyse vollautomatisch durch. Die MMA-Prozedur unterscheidet sich nur in der Zugabe von 25 µl IS MMA, das Waschen wird einmal mit Wasser und dreimal mit 0,01 N Essigsäure/Methanol-Mischung durchgeführt, die Elution mit 1,1 ml einer Mischung aus Essigsäure/Methanol und 1 N HCl im Verhältnis 9:1. Die Geräteeinstellungen werden abgeändert.

Berechnet wird die Konzentration als Quotient aus dem Integral des Peaks der Probenkurve und dem Integral des Peaks der Standardkurve, multipliziert mit folgenden Standardkonzentrationsfaktoren:

**Einheit Standardfaktor:**

- tHcy µmol/l 39,2
- Cys µmol/l 1000
- MMA nmol/l 4087,5

### **Formel zur Konzentrationsbestimmung im Analyt:**

Konzentration Analyt = [Peakintegral Analyt / Peakintegral Standard] x Konzentration Standard

### **Geräteeinstellung des Gaschromatographen:**

- Ofentemperatur: Min: 80°C Max: 310°C
- Einlasstemperatur: 230°C
- Injektionsvolumen: 1 µl
- Flussgeschwindigkeit: 1 ml/min

### **Retentionszeit:**

- tHcy: 13,1 min
- Cys: 17,1 min
- MMA: 9 min

#### *2.3.1.2 Messung von S-Adenosyl-Methionin und S-Adenosyl-Homocystein*

SAH und SAM können simultan mit einer Ultra Performance Flüssigkeitschromatographie (UPLC)-Tandem-Massenspektrometrie(MS)-Methode gemessen werden (116). Die Proben enthalten [<sup>13</sup>C<sub>5</sub>] -SAH und [<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]-SAM als IS. Beide Stoffe werden über eine Festphasenextraktion (solid phase extraction, SPE) aus der Probe (angesäuertes EDTA-Plasma) extrahiert und in geeignete Vials eluiert. Nach diesem Vorgang kann die vollautomatische Bearbeitung im oben genannten UPLC-MS/MS-Verfahren gestartet werden. Die Moleküle werden einzeln chromatographisch aufgetrennt. Die Menge der einzelnen chromatographisch aufgetrennten Moleküle wird danach massenspektrometrisch mit der Tandem-Massenspektrometrie-Prozedur bestimmt. Zwei Massenanalysatoren werden hintereinander geschaltet. Zwischen den beiden Massenanalysatoren wird den Ionen in einer Kollisionskammer weitere Energie zugeführt, sodass diese in noch kleinere, typische Ionen zerfallen, die wiederum vom Detektor gemessen werden. Da die Referenzwerte der Internen Standards bekannt sind, kann nun die Konzentration als Integral der Masse-Ladungs-Kurve des Massenspektrogramms im definierten Bereich berechnet werden (116).

### Geräte und Reagenzien:

- Eppendorf Zentrifuge 5810 R.
- Säulen zur SPE: BondElut<sup>®</sup> PBA der Firma Varian<sup>®</sup>, an deren Kieselsäure-Oberfläche Phenylboronsäure kovalent gebunden ist.
- Straight Barrel Cartridge, 100 mg 1 ml.
- SAH und SAM der Firma Sigma<sup>®</sup>.
- Waters Acquity UPLC der Firma Waters Corporation<sup>®</sup>, Milford, USA mit Acquity UPLC BEH C<sub>18</sub> Säule [50x2,1 mm (i.d.); 1,7 µm Partikelgröße; Waters Corporation<sup>®</sup>, Milford, USA] mit Vorsäule: Acquity BEH C<sub>18</sub> van Guard [5x2,1mm (i.d.) 1,7 µm Partikelgröße].
- Micro Mass Quattro Premier XE der Firma Waters Corporation<sup>®</sup>, Milford, USA
- Analysesoftware MassLynx V4.1 und QuanLynx.
- Pufferlösung: 20 mM Ammonium(NH<sub>4</sub>)-acetat-Lösung, pH 7,4
- Mobile Phase: Acetat/H<sub>2</sub>O-Lösung, pH 2,636
- Probenneutralisierung: 1 M NH<sub>3</sub>-Lösung.

### Interner Standard:

- S-Adenosyl-L-Methionin-d<sub>3</sub> (S-methyl-d<sub>3</sub>) Tetra(*p*-Toluensulfonat) (<sup>2</sup>H<sub>3</sub>-SAM) der Firma CDN – Isotopes
- S-(5'-Adenosyl)-L-Homocystein (<sup>13</sup>C<sub>5</sub>-SAH), Arbeitsgruppe von Henkjan Gellekink, Radboud Universität Nijmegen Medical Centre, Nijmegen, Niederlande

Die Säulen wurden fünf Mal mit 1 ml mobiler Phase und dann fünf Mal jeweils 1 Minute mit 1 ml Puffer bei 500 g konditioniert. Parallel dazu wurde der SAM-Stock 1:2 und der SAH-Stock 1:25 verdünnt und auf dieser Grundlage eine Kalibratorreihe erstellt. Der Ausgangskalibrator (200/48) bestand aus 48 nmol/l SAH und 200 nmol/l SAM.

### Kalibratoren:

0, 6, 12, 24 und 48 nmol/l SAH und 0, 25, 50, 100 und 200 nmol/l SAM in 20 mmol/l Ammoniumacetatpuffer, pH 7,4



**Qualitätskontrollen:**

High Control:	32 nmol/l SAH
	160 nmol/l SAM
Low Control:	8 nmol/l SAH
	40 nmol/l SAM

400 µl der einzelnen Kalibratoren wurden in neue Reaktionsgefäße übertragen, ebenso 400 µl der Proben (angesäuertes EDTA-Plasma). Den Proben (angesäuertes EDTA-Plasma) wurde dann zur Neutralisierung 40 µl 1 M NH<sub>3</sub> hinzugefügt, der Kalibratorreihe jeweils dieselbe Menge Puffer. Abschließend wurde der gesamten Messreihe noch je 25 µl IS-Mix beigemischt. So vorbereitet wurden die Proben aufgetragen und bei 250 g für 2 Minuten abzentrifugiert, daran anschließend zweimal mit 1 ml Puffer für eine Minute bei 500 g gespült und schließlich mit dreimal 350 µl mobiler Phase für zwei Minuten bei 250 g eluiert. Die Vials konnten dann bei -20°C eingefroren werden oder direkt mittels UPLC-MS/MS quantifiziert werden (116). Variationskoeffizienten für SAH und SAM sind in Tabelle 15 dargestellt.

**Geräteeinstellung:**

- Fluss: 0,3 ml/min
- Probenvolumen: 10 µl
- Retentionszeit: SAH 1,53 min  
SAM 0,53 min
- Laufzeit/Probe: 3 min

Tabelle 15: Variationskoeffizienten für SAH und SAM in Poolproben

	Analyt und Variationskoeffizient	Konzentration
Intraassay (n=12)	SAH: 3,9%	14,2 nmol/l
	SAM: 3,3%	90,0 nmol/l
Interassay (n=15)	SAH: 8,6%	13,7 nmol/l
	SAM: 7,5%	92,3 nmol/l

## 2.3.2 Messung von Vitaminen im Serum

### 2.3.2.1 Messung von Folat

Das Folat wurde mittels der UPLC-MS/MS- Methode gemessen (117). Die Probenaufbereitung wurde mittels Festphasenextraktion (Oasis MAX Säulen, Waters) durchgeführt. Die Probentrennung verfolgt mittels Flüssigchromatographie (Säule Acquity HSS T3) und saurem Methanolgradienten (mobile Phase A: Eisessiglösung, pH=2,6; mobile Phase B: Methanol). Detektion erfolgte mittels positiver Elektrosprayionisation im Massenspektrometer. Hierbei werden die einzelnen Folatformen erfasst (5-MethylTHF, 5-FormylTHF, 5,10-MethenylTHF, THF, Folsäure). Die Summe aus diesen Formen ergibt das Gesamtfolat.

### 2.3.2.2 Messung von Vitamin B<sub>12</sub>

Mit dem ADVIA Centaur® System von Bayer wurde die Messung der Konzentration von VitB<sub>12</sub> automatisiert durchgeführt. Das Verfahren beruht auf dem Nachweis der Chemilumineszenz markierter Antigene oder Antikörper. Nach dem Herauslösen des VitB<sub>12</sub> aus seiner Proteinbindung, werden die Proteine durch Marker als Bindungspartner ersetzt. VitB<sub>12</sub> bindet durch eine begrenzte Menge Intrinsic Factor, der in der Festphase vorhanden ist, an mit Acridiniumester markiertes VitB<sub>12</sub>. Das markierte VitB<sub>12</sub> erzeugt eine Signalstärke, die zum VitB<sub>12</sub> in der Probe antiproportional ist.

### 2.3.2.3 Messung von Holotranscobalamin

Holo-TC ist der sensitivste Marker für einen Mangelzustand im VitB<sub>12</sub>-Stoffwechsel (90). Die Konzentration von holo-TC im Serum wurde mit einem immunologischen Verfahren (Mikropartikel-Enzym-Immunoassay, MEIA®) nach Brady et al. (22) mit dem AxSYM Analyzer der Fa. Abbott® durchgeführt. Holo-TC spezifische Antikörper, die an Latex-Mikropartikeln fixiert sind, bilden Antigen-Antikörper-Komplexe mit dem holo-TC in der Probe. In einem zweiten Schritt erfolgt die farbliche Markierung der Antigen-Antikörper-Komplexe. Die Intensität der Fluoreszenz ist proportional zur Konzentration des holo-TC in der Probe.

#### *2.3.2.4 Messung von Vitamin D (25-Hydroxy-Vitamin D)*

Die Quantifizierung von 25-Hydroxy-VitD zu Studienbeginn und nach 12 Monaten Supplementation erfolgte mit dem Immun-Liaison-System (DiaSorin Deutschland GmbH, Dietzenbach, Germany). Das Immun-Liaison-System basiert auf einem kompetitiven immunoluminometrischen direkten Assay, das direkt beschichtete magnetische Mikropartikel benutzt und 25-Hydroxy-VitD<sub>2</sub> und 25-Hydroxy-VitD<sub>3</sub> in einer 25 µl Probe misst. Assay-Komponenten (Kalibrator, 2 Kontrollen, magnetische Partikel, Puffer) und Proben werden im Reaktionsmodul verteilt. Während der zehnminütigen Inkubationszeit dissoziiert das 25-Hydroxy-VitD von seinem Bindungsprotein und bindet an den spezifischen Antikörper der soliden Phase. Dann wird der Indikator (VitD gebunden an Isoluminol-Derivat) im System verteilt. Nach einer weiteren zehnminütigen Inkubationszeit wird ungebundenes Material durch einen Waschschrift entfernt. Startreagenzien werden hinzugefügt und das daraus resultierende Lichtsignal wird gemessen. Das Lichtsignal ist umgekehrt proportional zur 25-Hydroxy-VitD-Konzentration. Das Assay hat einen Messbereich von 4,0 (9,89 nmol/l) bis 150 ng/ml (374,4 nmol/l), mit einer funktionalen Sensitivität von <4,0 ng/ml.

### **2.3.3 Messung von Knochenmarkern im Serum und Urin**

#### *2.3.3.1 Messung der knochenspezifischen alkalischen Phosphatase*

Das, auf der Oberfläche von Osteoblasten befindliche, Glykoprotein BAP ist ein Indikator der Osteoblastenaktivität und Marker der Skelettmineralisation. Die Serumkonzentration von BAP wird mit Hilfe des MicroVue™ BAP Enzym-Immunoassay(EIA) der Firma Quidel® bestimmt. Monoklonale Anti-BAP-Antikörper sind auf Mikrotiterstreifen gebunden, an die die in der Probe vorhandene BAP bindet und Antigen-Antikörper-Komplexe bildet. Anschließend wird durch Zugabe einer Substratlösung eine Enzymreaktion des gebundenen BAP ausgelöst. Nach Zugabe einer Stopplösung kann man innerhalb von 15 Minuten die optische Dichte bei 405 nm abgelesen. Die gemessene optische Dichte ist proportional zur Konzentration des BAP in der Probe.

### *2.3.3.2 Messung von Osteocalcin*

Das durch Osteoblasten gebildete Protein OC macht 10-20% der nicht-kollagenen Proteine im Knochen aus. Intaktes OC kann als biochemischer Marker des Knochenumsatzes dienen. Die Bestimmung der OC-Konzentration im Serum wird mit einem Enzym-Immunoassay (EIA) nach Gomez et al. (61) der Firma Quidel® durchgeführt. Dabei werden jeweils 25 µl Patientenserum und 125 µl Antiosteocalcin-Antikörper von Mäusen auf Teststreifen gegeben, die mit OC beschichtet sind.

Es entsteht eine Konkurrenzsituation zwischen dem OC im Serum und dem Teststreifen-Osteocalcin um den Anti-OC-Antikörper. Nach Herauswaschen der freien Serum-OC-Antikörper-Komplexe wird ein anti-Maus-IgG-Antikörper zugefügt, der an die am Teststreifen-OC gebundenen Antikörper bindet. Nach Auslösen der Enzymreaktion wird die Extinktion bei 405 nm gemessen. Die Extinktion ist umso niedriger, je mehr Anti-OC-Antikörper vom in der Probe befindlichen OC gebunden wurden.

### *2.3.3.3 Messung der Isoform 5b der Tartrat-resistenten sauren Phosphatase*

Osteoklasten sezernieren das Glykoprotein TRAP5b in positiver Korrelation mit ihrer Aktivität. Die Menge an TRAP5b im Serum lässt also, als Indikator für die Osteoklastenaktivität, Rückschlüsse auf die Knochenresorption zu. Die Bestimmung des TRAP5b im Serum erfolgt mit einem Immunocapture-Enzymassay. Im MicroVue TRAP5b-Assay der Firma Quidel® wird der monoklonale Antikörper Trk62 als Capture-Antikörper für aktives TRAP5b genutzt. TRAP5b bildet einen Antigen-Antikörper-Komplex mit dem an die Mikrotiterplatten gebundenen spezifischen Antikörper Trk62. Die Enzymaktivität des TRAP5b kann nach Zugabe einer Substratlösung gemessen werden. Die Extinktion wird bei 405 nm gemessen. Die Stärke der Färbung ist direkt proportional zur TRAP5b-Konzentration in der Probe.

### *2.3.3.4 Messung von Sclerostin*

Osteozyten sezernieren SCL. SCL greift regulierend in die Osteoblastenfunktion ein und ist ein Marker für die Knochenresorption. Zur Bestimmung des SCL im Serum wird das Teco® SCL EIA Kit verwendet. Das Teco® SCL EIA Kit beruht auf dem Prinzip des Immunocapture-ELISA. Die Serumproben werden mit einem Biotin-markierten polyklonalen Antikörper und einem Peroxidase-markierten monoklonalen Antikörper in einer Streptavidin-beschichteten Mikrotiterplatte 22-26 Stunden inkubiert. Zwischen dem Peroxidase-markierte monoklonale

Antikörper und dem in der Probe befindlichen SCL bildet sich ein Antigen-Antikörper-Komplex. Dieser Komplex wird über den Biotin-markierten Antikörper durch Bindung an Streptavidin fixiert. Nach Einhaltung der vorgeschriebenen Inkubationszeit folgt ein Waschschritt zum Entfernen des ungebundenen Materials. Die Enzymaktivität der Peroxidase wird danach durch Hinzufügen einer Substratlösung gestartet. Die Stärke der Farbreaktion kann als Extinktion bei 450 nm abgelesen werden und ist proportional zur Menge des in der Probe befindlichen SCL.

#### *2.3.3.5 Messung von Deoxypyridinolin-Crosslinks im Urin*

Im Rahmen der Knochenresorption werden DPD-Crosslinks in den Blutkreislauf freigesetzt. Die Ausscheidung erhöhter Mengen DPD-Crosslinks im Urin kann als Hinweis auf verstärkte Knochenresorption gewertet werden. Zur Messung der DPD-Crosslinks wird ein kompetitiver Enzym-Immunoassay, das MicroVue DPD Assay der Firma Quidel<sup>®</sup>, verwendet. Die Messungen sollten an Proben des zweiten Morgenurins durchgeführt werden. Beim oben genannten Enzym-Immunoassay konkurriert das in der Probe befindliche DPD mit alkalischer DPD-Phosphatase um die Bindung der am Teststreifen fixierten Anti-DPD-Antikörper. Nach Zugabe der Substratlösung wird die Stärke der Enzymreaktion bei 405 nm abgelesen. Die Menge der in der Probe enthaltenen DPD-Crosslinks ist umgekehrt proportional zur Stärke der Enzymreaktion. Eine Korrektur der „urinären“ Konzentration durch Kreatinin ist notwendig.

### **2.3.4 Messung weiterer Routineparameter im Blut**

#### Messung von Kreatinin

Kreatinin bildet in alkalischen Medien mit Pikrinsäure eine gelb-orangene Verbindung (Jaffé-Reaktion). Die farbliche Intensität des Komplexes kann photometrisch gemessen werden und ist proportional zur Konzentration des Kreatinins in der Probe. Die Analyse wurde mit Geräten und Material der Firma Roche Diagnostics<sup>®</sup> durchgeführt.

## Messung von ALAT

Die Bestimmung des Leberenzym Alanin-Aminotransferase (ALAT) wurde nach den aktuellen Empfehlungen der International Federation of Clinical Chemistry (IFCC) bei 37°C mit Pyridoxalphosphat-Zusatz vorgenommen. Das Prinzip der Messmethode ist kinetisch-photometrisch, es wird vom Umsatz  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  auf das vorhandene Enzym geschlossen.

## Messung von CRP

CRP wird mittels immunologischer Turbidimetrie/Nephelometrie bestimmt. Nach einer Antigen-Antikörper-Reaktion des CRP kommt es zu einer typischen Veränderung der Absorption (Turbidimetrie) bzw. des Streulichts (Nephelometrie) eines Licht- oder Laserstrahls in einer Suspension.

## Blutbild

Das Blutbild beinhaltete Hämoglobinwert, Hämatokrit, Erythrozyten, Leukozyten und Thrombozyten und wurde mithilfe des SYMEX SF 3000 oder SYMEX XE 5000 angefertigt.

## 2.3.5 Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe der Software SPSS 19.0 (SPSS Inc. Chicago, IL, USA). Soweit nicht anders angegeben, sind die Ergebnisse als Mediane (10.-90. Perzentile) dargestellt. Der Vergleich der Mittelwerte mehrerer Gruppen erfolgte mit dem ANOVA-Test und den post-hoc Tamhane-Tests. Für Tests, die Normalverteilung erfordern, wurden die Daten logarithmisch transformiert. Um die Mediane zwischen zwei Gruppen zu vergleichen wurde der Mann-Whitney-U Test herangezogen. Um die Ergebnisse innerhalb einer Gruppe über die Zeit zu vergleichen, wurde der paired-T-Test verwendet. Korrelationen zwischen verschiedenen Variablen wurden mit dem Spearman-Test überprüft. Als signifikant wurden p-Werte unter 0,05 erachtet.

### 3. Ergebnisse

Ein Teil der Ergebnisse ist schon von der Arbeitsgruppe Herrmann et al. veröffentlicht worden (87). Die Daten der wenigen Parameter, die wir nach 6 Monaten testeten, sind aus Gründen der Relevanz und Übersichtlichkeit nur eingeschränkt dargestellt, liegen dem Verfasser dieser Arbeit jedoch vollständig vor.

#### 3.1 Allgemeine Charakteristik der Teilnehmerpopulation

Den in Tabelle 16 dargestellten Daten kann entnommen werden, dass in Gruppe A mehr als doppelt so viele Frauen (69%) wie Männer waren, während in Gruppe B das Verhältnis zwischen Männern und Frauen fast ausgeglichen war. Teilnehmer, die Alkohol konsumierten, gab es in beiden Gruppen gleichermaßen (Gruppe A n=21 gegenüber Gruppe B n=16). In der Anzahl der Teilnehmer, die eine Statintherapie benötigten, unterschieden sich Gruppe A und B nahezu nicht (n=9 gegenüber n=10). Das mediane Alter beider Gruppen war vergleichbar. Die Teilnehmer der Gruppe B waren im Vergleich 2,5 Jahre älter, als die Teilnehmer der Gruppe A (Gruppe A 68 Jahre gegenüber Gruppe B 70,5 Jahre). Bezüglich ihres BMI unterschieden sich die Teilnehmer beider Gruppen im Mittel kaum.

Tabelle 16: Allgemeine Charakteristik der Teilnehmerpopulation zu Studienbeginn

Variable	Gruppe A	Gruppe B	p-Wert
	456 mg Calcium, 1200 IE VitD, 500 µg B <sub>12</sub> , 500 µg Folsäure, 50 mg B <sub>6</sub> n=48	456 mg Calcium, 1200 IE VitD n=45	
Alter, Jahre	68,0 (54,2-82,8)	70,5 (58,0-85,6)	0,089
Frauen, n (%)	33 (69%)	21 (47%)	0,037*
Alkoholkonsum, n (%)	21 (44%)	16 (35%)	0,530*
Statintherapie, n (%)	9 (19%)	10 (24%)	0,616*
Gewicht, kg	76,0 (59,0-96,6)	70,0 (56,0-98,0)	0,720
BMI, kg/(m <sup>2</sup> )	26,3 (23-31,5)	26,2 (21,8-32)	0,383

Daten sind Median (10.-90. Perzentile). P-Werte gemäß Mann-Whitney-U Test.

\*: p-Werte entsprechend des Chi-Quadrat-Tests

### 3.2 Charakteristik der Teilnehmerpopulation

Die Serum-Konzentrationen von Hämoglobin, Erythrozyten, Kreatinin, Glukose, CRP, Ferritin, Cholesterin, HDL, LDL und Triglyzeriden, sowie der Hämatokrit, sind in Tabelle 17 dargestellt. Die Erythrozytenkonzentration war in Gruppe A signifikant höher als in Gruppe B ( $p < 0,05$ ). Die Ferritinkonzentration war in Gruppe B signifikant höher als in Gruppe A ( $p < 0,05$ ). Die Glukosekonzentration war in beiden Gruppen, der Cholesterin-Serumspiegel lediglich in Gruppe A leicht erhöht. Die holoTC-Konzentrationen (Referenzwert: holoTC im Serum  $\geq 35$  pmol/l) schließen bei allen Probanden einen manifesten VitB<sub>12</sub>-Mangel aus.

Tabelle 17: Konzentrationen ausgesuchter Blutparameter, Studienbeginn

Variable	Gruppe A		Gruppe B		p-Wert
	1200 IE VitD, 456 mg Kalzium, 500 µg B <sub>12</sub> , 500 µg Folsäure, 50 mg B <sub>6</sub>	n	1200 IE VitD, 456 mg Kalzium	n	
Hämoglobin, g/dl	14,4 (12,6-16,1)	39	14,2 (12,4-15,4)	39	0,121
Hämatokrit, %	42,5 (39,3-47,5)	39	41,9 (36,9-45,2)	39	0,079
Erythrozyten, x 10 <sup>12</sup> /l	4,87 (4,26-5,32)	39	4,66 (4,07-5,10)	39	0,010
Kreatinin, mg/dl	0,80 (0,60-1,28)	41	0,90 (0,60-1,29)	40	0,867
Glukose, mg/dl	104 (94-125)	41	106 (88-137)	40	0,590
Albumin, g/l	44,0 (41,0-46,8)	41	44,0 (40,9-47,0)	38	0,589
ALAT, U/l	22,0 (14,2-44,4)	41	23,5 (14,1-40,5)	40	0,917
CRP, mg/l	1,50 (0,60-5,28)	41	1,05 (0,60-4,78)	40	0,211
Ferritin, ng/ml	104 (35-346)	41	227 (42-440)	40	0,027
Cholesterin, mg/dl	208 (149-254)	41	200 (142-261)	40	0,688
HDL-Cholesterin, mg/dl	56 (37-84)	41	55 (33-94)	40	0,561
LDL-Cholesterin, mg/dl	131 (94-168)	27	126 (69-173)	31	0,668
Triglyzeride, mg/dl	101 (60-165)	41	116 (64-281)	40	0,279
holoTC, pmol/l	53 (35-79)	41	47 (26-85)	36	0,288

Daten sind Median (10.-90. Perzentile). P-Werte gemäß Mann-Whitney-U Test.

ALAT: Aminotransferase, CRP: C-reaktives-Protein, HDL: High-density-lipoprotein, LDL: Low-density-lipoprotein, holoTC: Holotranscobalamin.



### 3.3 Charakteristik der Metabolite und Vitamine

Tabelle 18: Konzentrationen der Vitamine und Metabolite zu Studienbeginn und nach 12 Monaten in Gruppe A und B

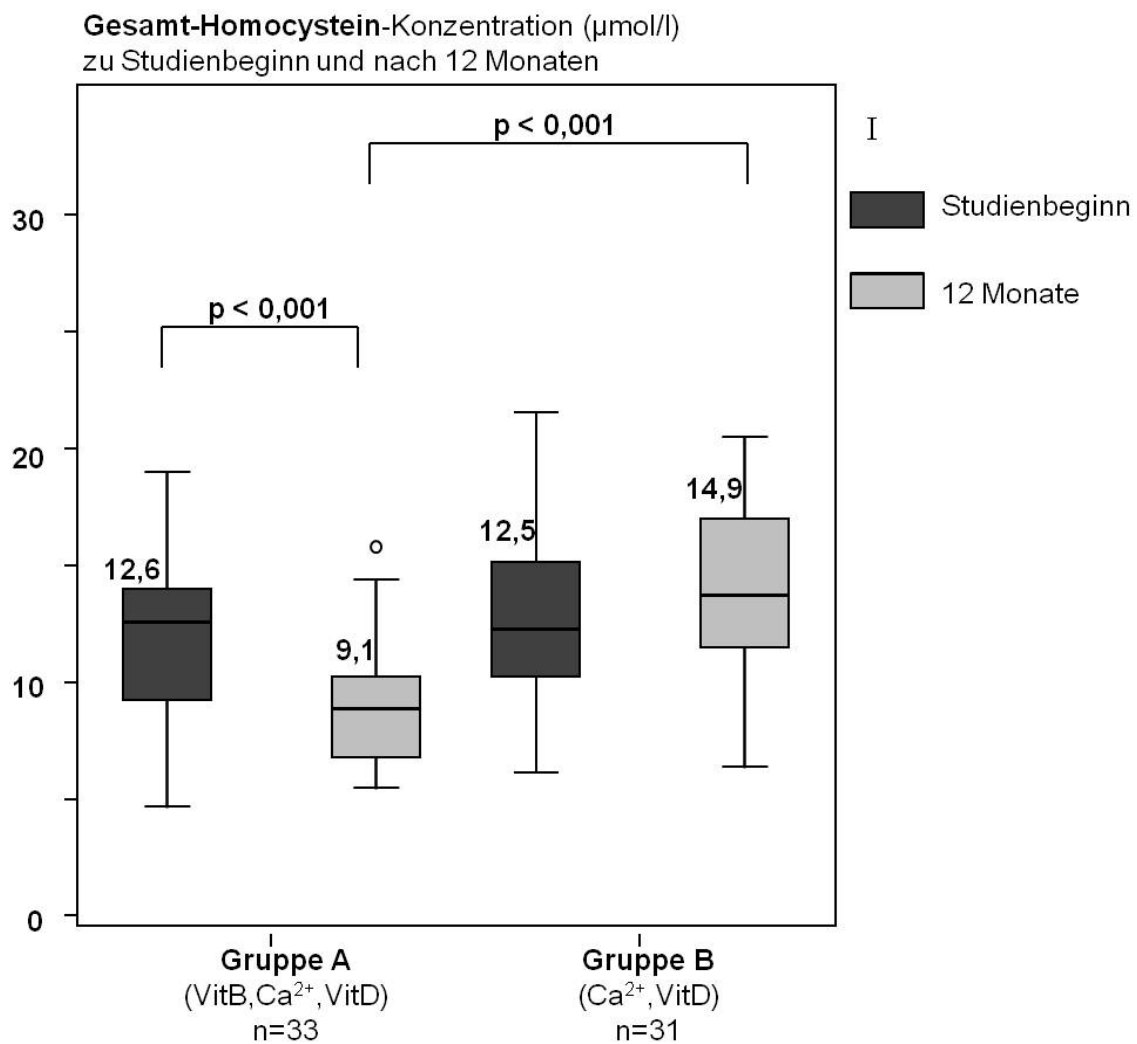
Gruppe A				
1200 IE VitD, 456 mg Kalzium, 500 µg Folsäure, 500 µg B <sub>12</sub> , 50 mg B <sub>6</sub>				
Variable	n	Studienbeginn	12 M	p-Wert
tHcy, µmol/l	33	12,6 (7,4-19,0)	9,1 (6,0-14,0)	<b>&lt;0,001</b>
SAM, nmol/l	32	121 (88-179)	119 (91-194)	0,533
SAH, nmol/l	32	17,7 (11,3-24,7)	17,7 (11,4-39,5)	0,086
SAM/SAH-Quotient	32	7,1 (5,5-9,7)	7,0 (4,2-9,5)	0,562
MMA, nmol/l	34	222 (132-440)	212 (146-303)	0,089
VitB <sub>12</sub> , pg/ml	29	394 (235-724)	592 (441-996)	<b>&lt;0,001</b>
Gesamtfolat, nmol/l	34	16,8 (7,2-37)	50,5 (21,7-74)	<b>&lt;0,001</b>
VitD, ng/ml	22	14,8 (4,5-26,6)	31,6 (17-43)	<b>&lt;0,001</b>
Gruppe B				
1200 IE VitD, 456 mg Kalzium				
Variable	n	Studienbeginn	12 M	p-Wert
tHcy, µmol/l	31	12,5 (8,5-21,1)	14,9 (8,7-28,5)	0,093
SAM, nmol/l	30	116 (94-158)	120 (78-160)	<b>0,007</b>
SAH, nmol/l	30	18,3 (11,3-32,3)	18,9 (11,3-42)	<b>0,006</b>
SAM/SAH-Quotient	30	6,3 (4,0-8,5)	5,6 (3,3-8,8)	0,105
MMA, nmol/l	31	212 (120-407)	237 (143-478)	0,053
VitB <sub>12</sub> , pg/ml	24	397 (225-618)	360 (217-535)	0,106
Gesamtfolat, nmol/l	31	20,0 (7,2-50)	15,5 (6,7-38)	0,068
VitD, ng/ml	18	13,8 (4,3-27,4)	28,3 (22,2-39)	<b>&lt;0,001</b>

Daten sind als Mediane angegeben (10.-90. Perzentile); p-Werte gemäß paired T-Test; pmol/l = 0,74 x pg/ml; M: Monate; tHcy: Gesamthomocystein; SAM: S-Adenosyl-Methionin; SAH: S-Adenosyl-Homocystein; SAM/SAH-Quotient: Methylierungsindex; MMA: Methylmalonsäure; VitB<sub>12</sub>: Vitamin B<sub>12</sub>; VitD: 25-Hydroxy-Vitamin D<sub>3</sub>

Die Blutwerte der Vitamine und Metabolite beider Gruppen zu Studienbeginn und nach 12 Monaten sind in Tabelle 15 dargestellt. Nach 12 Monaten waren zwischen den Gruppen A und B Die Serumspiegel für VitB<sub>12</sub> ( $p<0,001$ ), tHcy ( $p<0,001$ ) und Cys ( $p<0,005$ ) signifikant unterschiedlich. Kein Studienteilnehmer wies zu Studienbeginn einen VitB<sub>12</sub>-Serumspiegel auf, der außerhalb des Normbereichs lag (Tabelle 18). Nach 12 Monaten war in Gruppe A der VitB<sub>12</sub>-Serumspiegel um 53% des Ausgangswertes angestiegen, in Gruppe B sank er binnen 12 Monaten leicht ab. In beiden Gruppen starteten die Teilnehmer durchschnittlich mit einer moderaten HHcy (Tabelle 18). In Gruppe A beobachteten wir nach 12 Monaten ein Absinken des tHcy-Serumspiegels um 25%. In Gruppe B stieg der tHcy-Serumspiegel leicht an.

### 3.3.1 Gesamt-Homocystein-Konzentration und Gesamt-Folat-Konzentration zu Studienbeginn und nach 12 Monaten

In beiden Gruppen beobachteten wir zu Studienbeginn einen hochnormalen bis moderat erhöhten tHcy-Serumspiegel (Abbildung 6). Die Serumkonzentrationen von tHcy sanken innerhalb von 12 Monaten in Gruppe A im Mittel um 29% (von 12,6 auf 9,1  $\mu\text{mol/l}$ ) ( $p < 0,001$ ). In Gruppe B stiegen die tHcy-Serumspiegel innerhalb von 12 Monaten um 12% des Ausgangswerts (von 12,5 auf 14,9  $\mu\text{mol/l}$ ). Im Vergleich beider Gruppen war der Unterschied der Konzentrationen nach 12 Monaten hochsignifikant ( $p < 0,001$ ). Die Gesamt-Folat-Konzentration erhöhte sich in Gruppe A signifikant ( $p < 0,001$ ), in Gruppe B sank sie leicht ab.



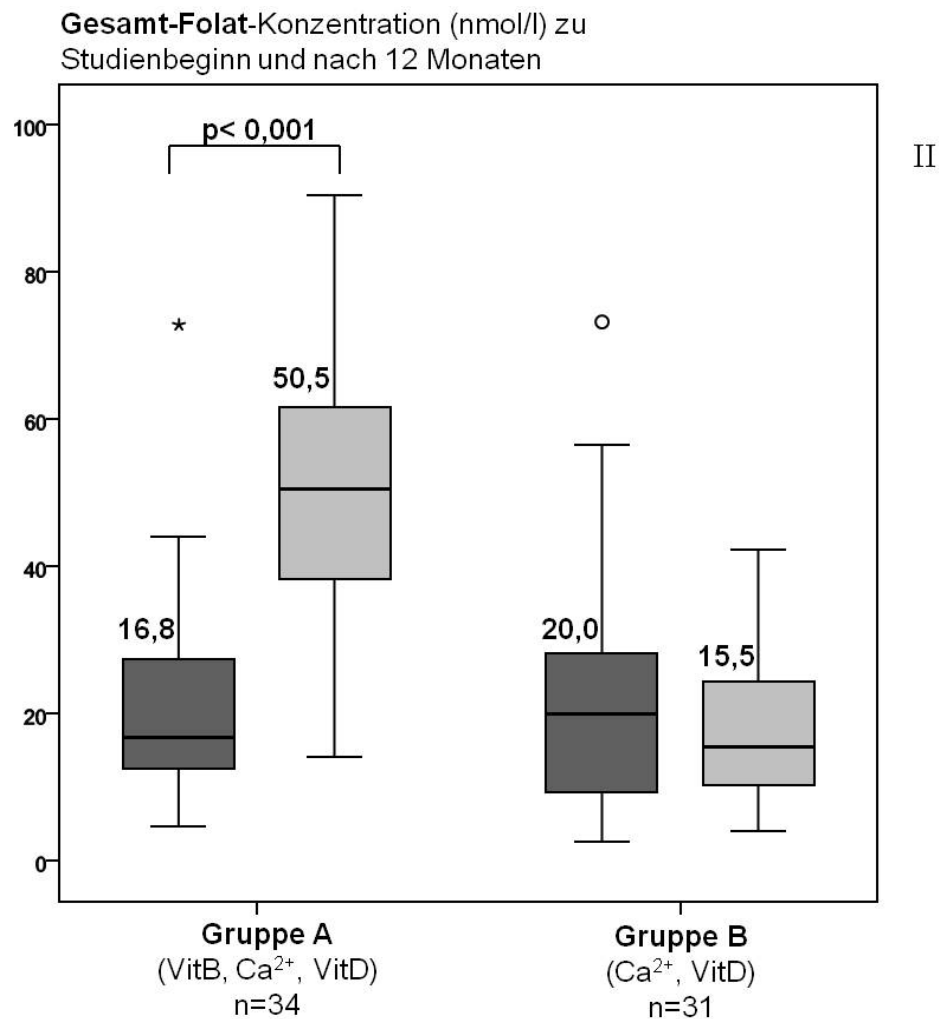
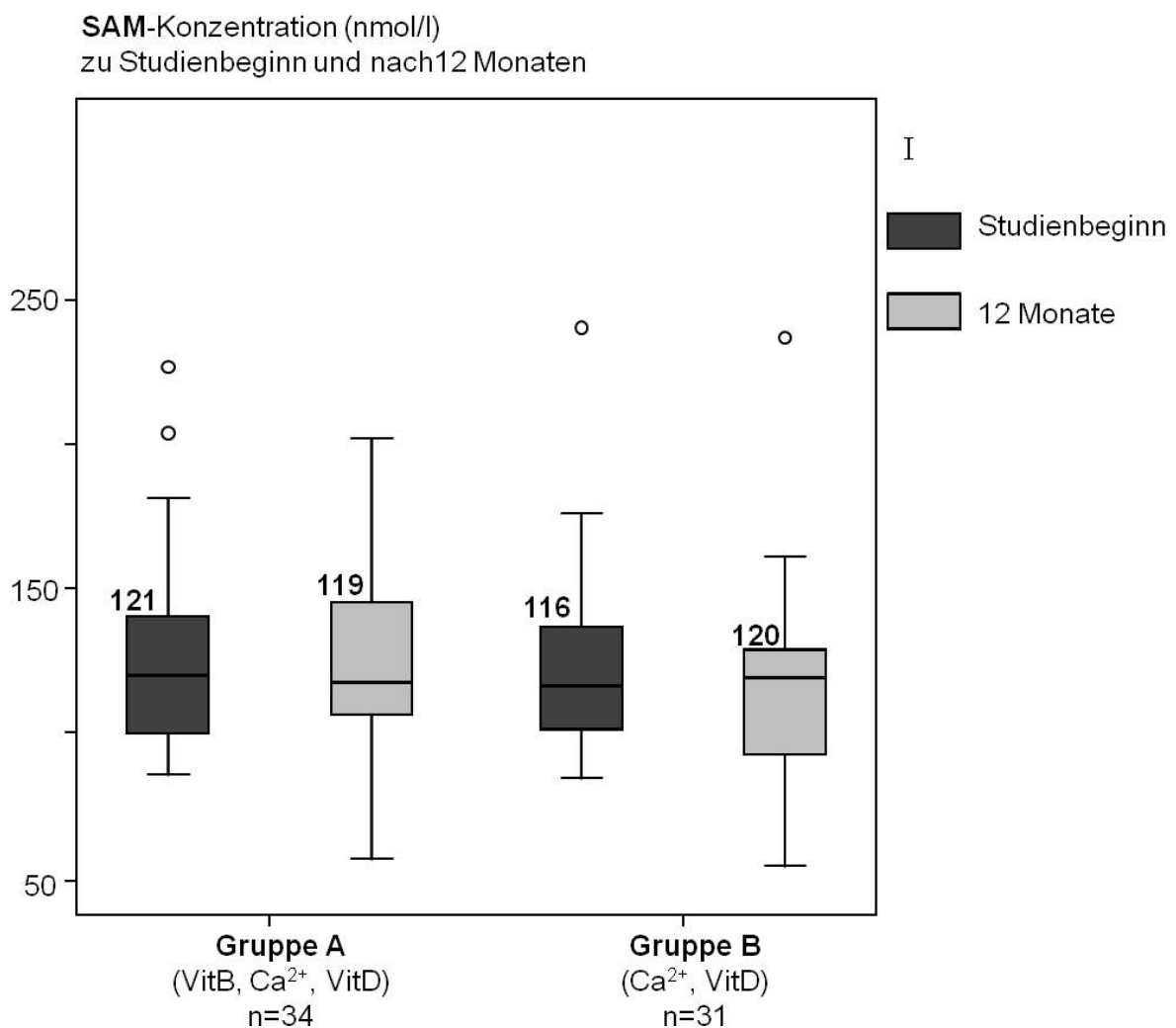


Abbildung 6: Gesamthomocystein-Konzentration (tHcy) ( $\mu\text{mol/l}$ ) (I) und Gesamt-Folat-Serumkonzentration (nmol/l) (II) zu Studienbeginn und nach 12 Monaten, Werte sind Mediane (10.-90. Perzentile), p-Werte nach paired T-Test

### 3.3.2 S-Adenosyl-Methionin- und S-Adenosyl-Homocystein-Konzentration zu Studienbeginn und nach 12 Monaten

Die mediane SAM-Konzentration im Serum sank in Gruppe A innerhalb von 12 Monaten geringfügig um 2 nmol/l und stieg in Gruppe B innerhalb von 12 Monaten geringfügig um knapp 3 nmol/l an. Die SAH-Konzentration im Serum stieg in Gruppe A innerhalb von 12 Monaten um 2,5 nmol/l und stieg in Gruppe B innerhalb von 12 Monaten um 2,4 nmol/l an (Abbildung 7 7). Weder der Anstieg innerhalb einer Gruppe noch die Konzentrationsunterschiede im Gruppenvergleich waren signifikant.



**SAH-Konzentration (nmol/l) zu Studienbeginn und nach 12 Monaten**

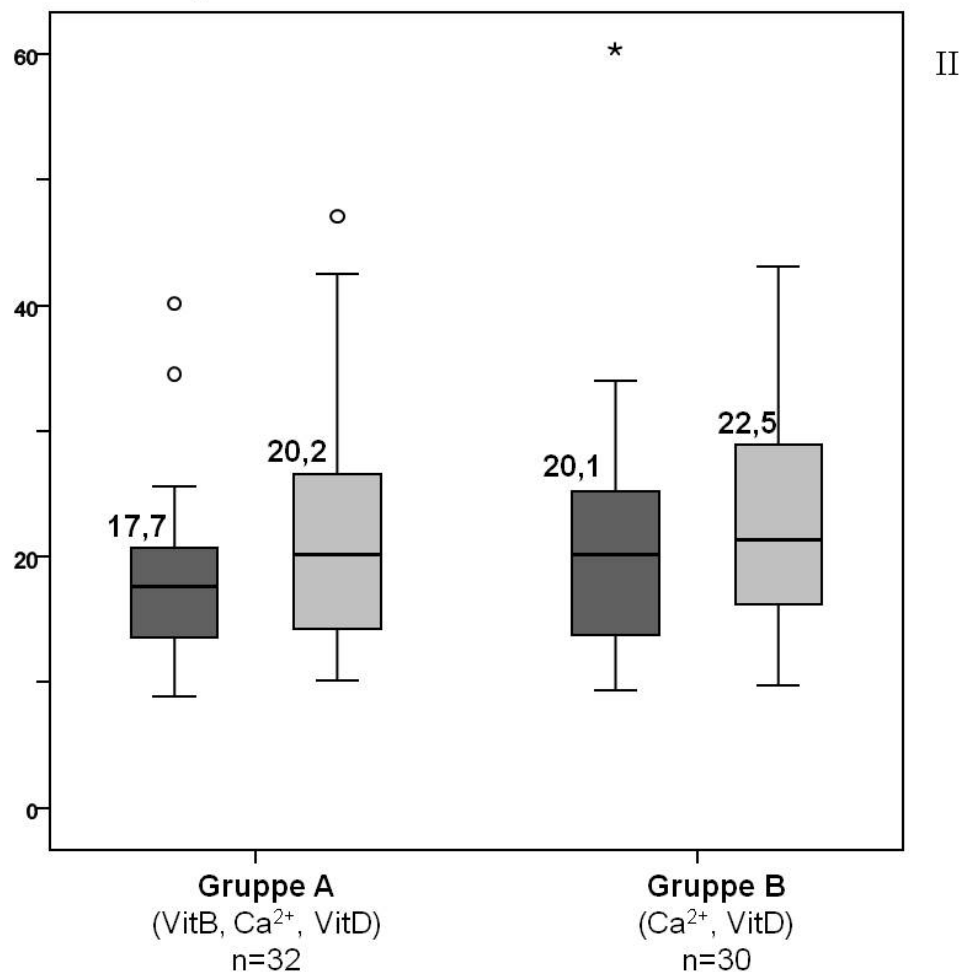
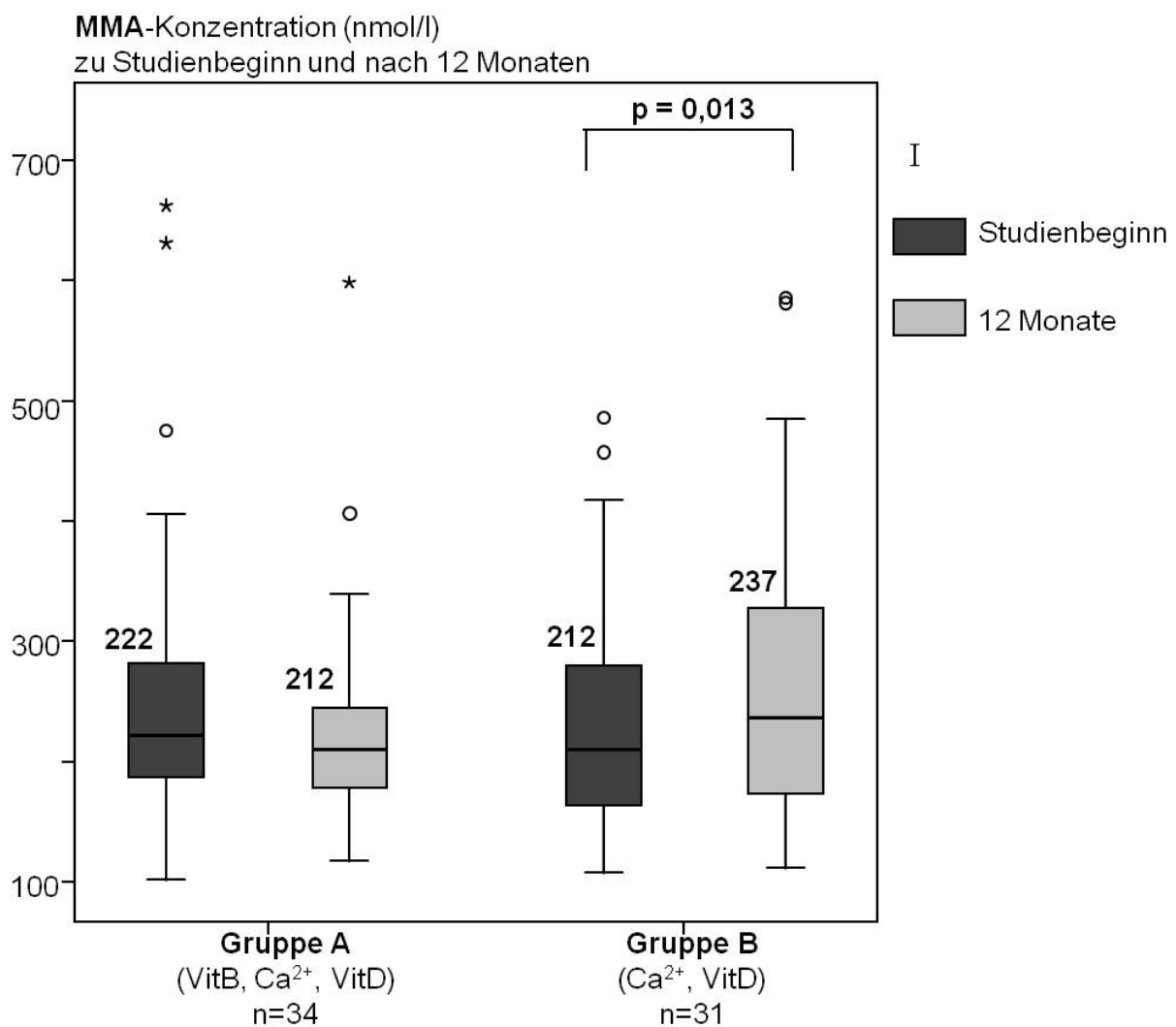


Abbildung 7: SAM- (I) und SAH-Konzentration (II) (nmol/l) zu Studienbeginn und nach 12 Monaten, Werte sind Mediane (10.-90. Perzentile)

### 3.3.3 Methylmalonsäure-Konzentration und Vitamin-B<sub>12</sub>-Konzentration im Serum zu Studienbeginn und nach 12 Monaten

Im Vergleich zwischen Studienbeginn und Studienende sank in Gruppe A die MMA-Konzentration leicht ab, in Gruppe B stieg die MMA-Konzentration binnen 12 Monaten deutlich an ( $p = 0,053$ ) (Tabelle 18). Nach 12 Monaten waren die medianen Serumkonzentrationen von VitB<sub>12</sub>, im Vergleich zum Ausgangswert, in Gruppe A um 64% signifikant gestiegen ( $p < 0,001$ ). Nach 12 Monaten war zwischen den Gruppen A und B die Serumspiegel für VitB<sub>12</sub> signifikant ( $p < 0,001$ ) unterschiedlich (Abbildung 8).



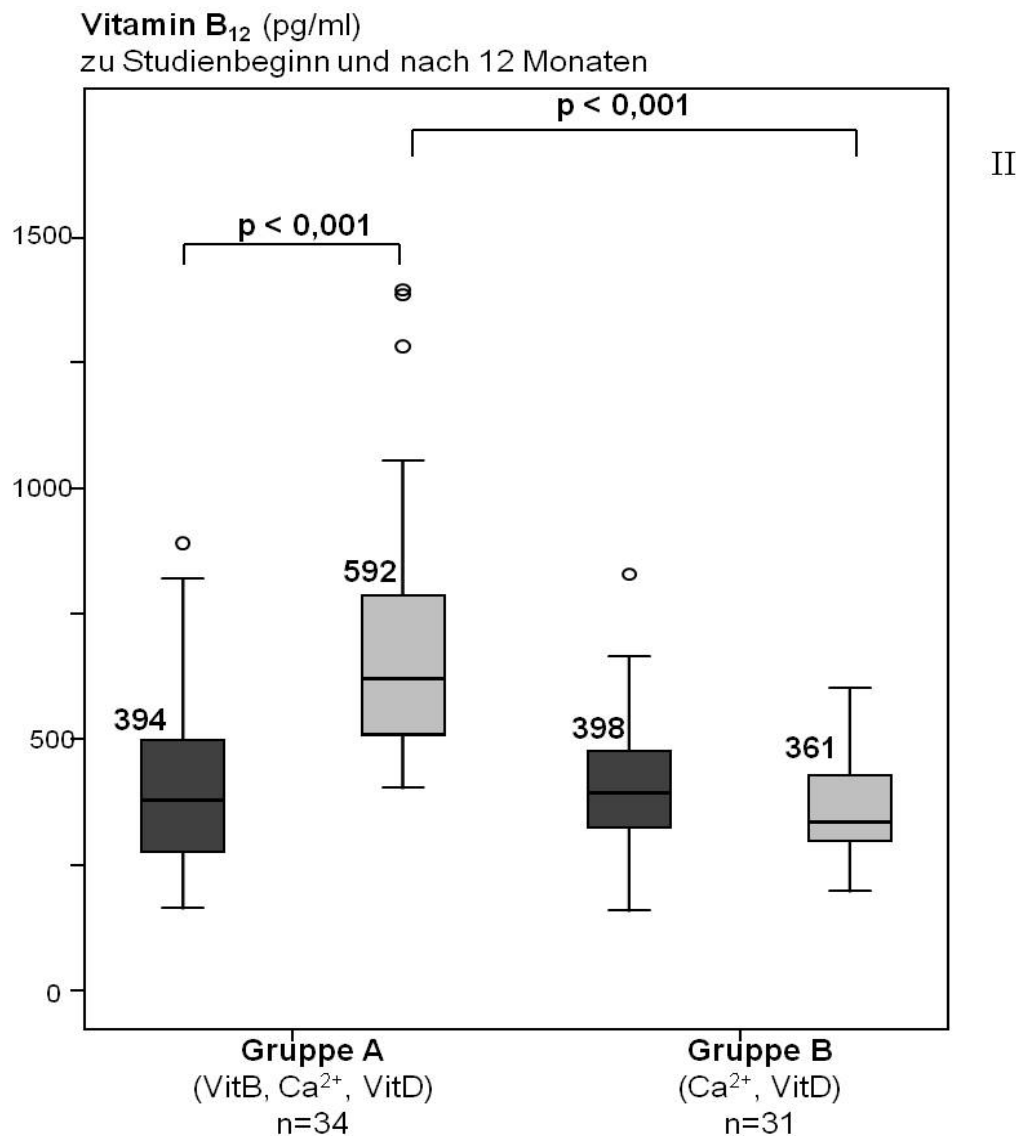


Abbildung 8: Die Konzentration von MMA (nmol/l) (I) und VitB<sub>12</sub> (pg/ml) (II) zu Studienbeginn und nach 12 Monaten; Werte sind Mediane (10.-90. Perzentile), p-Werte nach paired T-Test bzw. Mann-Whitney-U Test



### 3.3.4 Vitamin-D-Konzentration zu Studienbeginn und nach 12 Monaten

Die medianen VitD-Spiegel zeigten zu Studienbeginn in beiden Gruppen einen ausgeprägten VitD-Mangel (<20 ng/ml). Nach 12 Monaten waren die VitD-Spiegel in beiden Gruppen signifikant angestiegen (Abbildung 9).

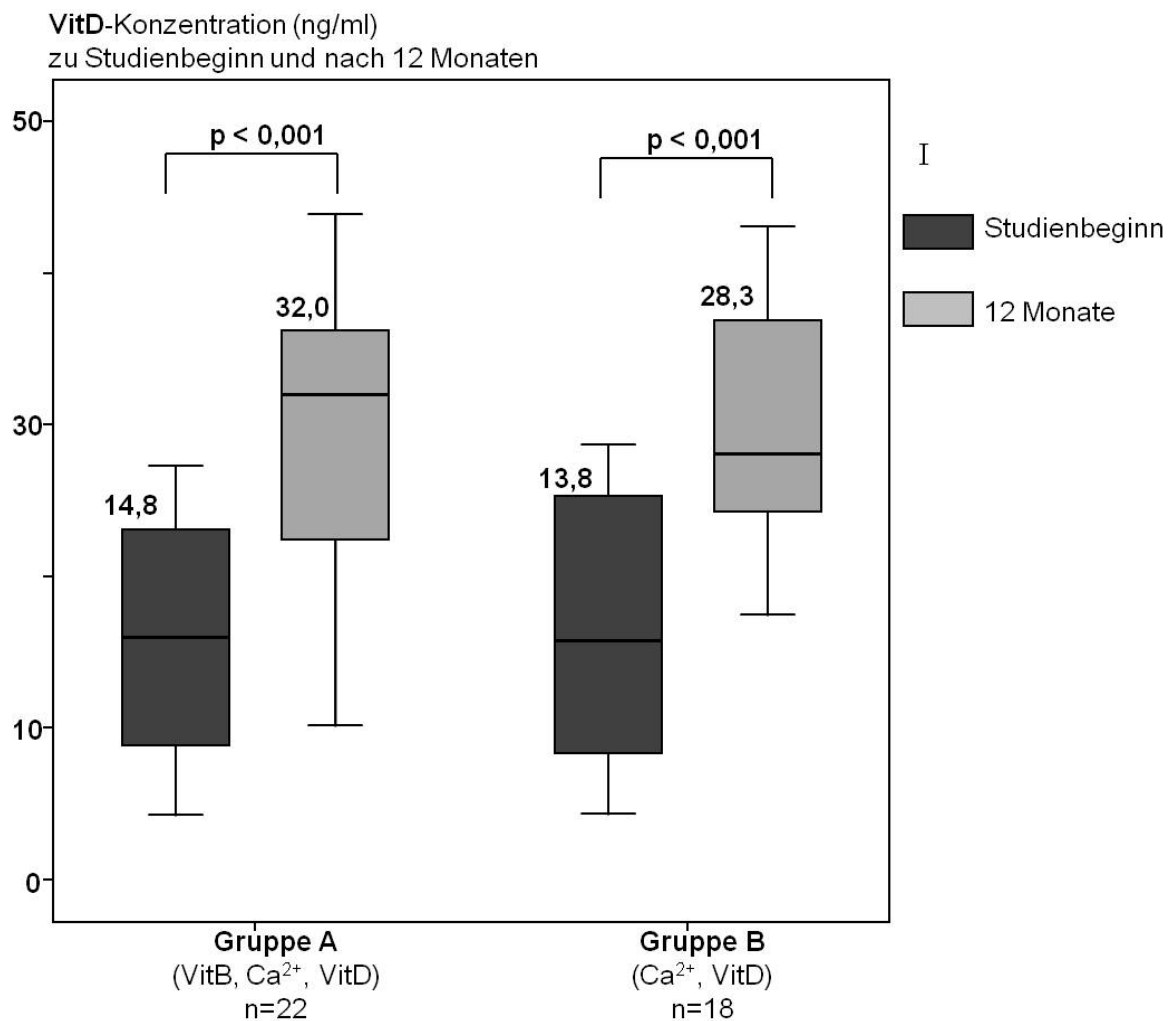


Abbildung 9: VitD-Konzentration (ng/ml) zu Studienbeginn und nach 12 Monaten, Werte sind Mediane (10.-90. Perzentile), p-Werte gemäß paired T-Test

Tabelle 19: Knochenmarker aller Studienteilnehmer im Verlauf

	n	Start	n	6 M	p-Wert (Start-6M)	n	12 M	p-Wert (Start-12 M)
Gruppe A								
PTH, pg/ml	43	64 (29,9-133)	35	46 (35,3-79,6)	<b>&lt;0,001</b>	34	46 (23,4-71,5)	<b>&lt;0,001</b>
BAP, U/l	34	24,8 (17,2-51)	35	22,9 (15,3-42)	<b>0,001</b>	34	24,1 (14,3-43)	<b>0,040</b>
OC, ng/ml	34	8,8 (5,7-12,1)	35	7,7 (3,8-12,2)	0,139	34	5,5 (2,7-10)	<b>0,002</b>
TRAP5b, U/l	32	2,13 (1,18-4,9)	34	2,39 (1,02-3,84)	0,627	34	2,00 (0,86-3,39)	0,189
SCL, ng/ml	34	0,56 (0,35-0,84)	35	0,65 (0,37-1,07)	<b>&lt;0,001</b>	33	0,68 (0,48-1,28)	<b>&lt;0,001</b>
DPD, nmol/mmol Kreatinin	33	6,8 (3,8-10,4)	32	6,4 (4,0-9,9)	0,200	31	7,0 (4,1-11,1)	0,149
Gruppe B								
PTH, pg/ml	42	78 (38-157)	31	44 (29,5-87)	<b>&lt;0,001</b>	31	45 (24,2-113)	<b>&lt;0,001</b>
BAP, U/l	35	29,6 (18,7-42)	31	22,4 (16,4-40)	<b>0,018</b>	30	24,8 (16,5-39)	<b>0,019</b>
OC, ng/ml	34	8,3 (5,5-12,3)	31	7,3 (3,4-14,7)	0,419	31	4,2 (2,7-11,9)	<b>&lt;0,001</b>
TRAP5b, U/l	30	2,42 (1,47-5,11)	31	2,17 (1,41-5,0)	0,604	30	1,55 (0,87-3,18)	<b>&lt;0,001</b>
SCL, ng/ml	34	0,53 (0,39-0,92)	30	0,64 (0,46-1,09)	<b>&lt;0,001</b>	31	0,73 (0,46-1,18)	<b>0,002</b>
DPD, nmol/mmol Kreatinin	32	5,8 (3,7-8,4)	29	6,6 (3,8-10,5)	0,142	31	5,6 (3,9-10,5)	0,959

Alle Daten sind Mediane (10.-90. Perzentile). P-Werte wurden entsprechend des paired-t-Tests berechnet. **Gruppe A:** 500 µg Folsäure, 500 µg VitB<sub>12</sub>, 50 mg VitB<sub>6</sub>, 456 mg Ca<sup>2+</sup> und 1200 IE VitD<sub>3</sub> /d. **Gruppe B:** 456 mg Ca und 1200 IE VitD<sub>3</sub> /d; M: Monate; PTH: Parathormon; BAP: Bone Alkaline Phosphatase; OC: Osteocalcin; TRAP5b: Tartrat-Resistant-Alkaline-Phosphatase 5b; SCL: Sclerostin; DPD: Desoxypyridinolin

### 3.3.5 Konzentration der Knochenmarker zu Studienbeginn und nach 12 Monaten

Die BAP-Konzentration sank in Gruppe A innerhalb des Studienzeitraums um 3,2% ( $p=0,040$ ) und in Gruppe B um 9,5% ( $p=0,019$ ). Die OC-Konzentration sank im Zeitraum von 12 Monaten in der Gruppe A um 45,1% ( $p<0,002$ ) und in der Gruppe B um 35,6% ( $p<0,001$ ). Die Serumkonzentration von TRAP5b sank innerhalb von 12 Monaten in Gruppe A um 34,8% und in Gruppe B um 21,7% ( $p<0,001$ ). Die Serumkonzentration von SCL stieg im Beobachtungszeitraum in Gruppe A um 28,7% ( $p<0,001$ ) und in Gruppe B um 32% ( $p=0,002$ ) (Abbildung 10). Die Konzentration von DPD/Kreatinin stieg innerhalb von 12 Monaten in Gruppe A um 1,6 % und in Gruppe B um 4,8%. Die PTH-Konzentration sank im Zeitraum von 6 Monaten signifikant in der Gruppe A um 38,6% ( $p<0,001$ ) und in der Gruppe B um 39,3% ( $p<0,001$ ) und zeigte in den folgenden 6 Monaten keine nennenswerten Veränderungen mehr (Tabelle 16).

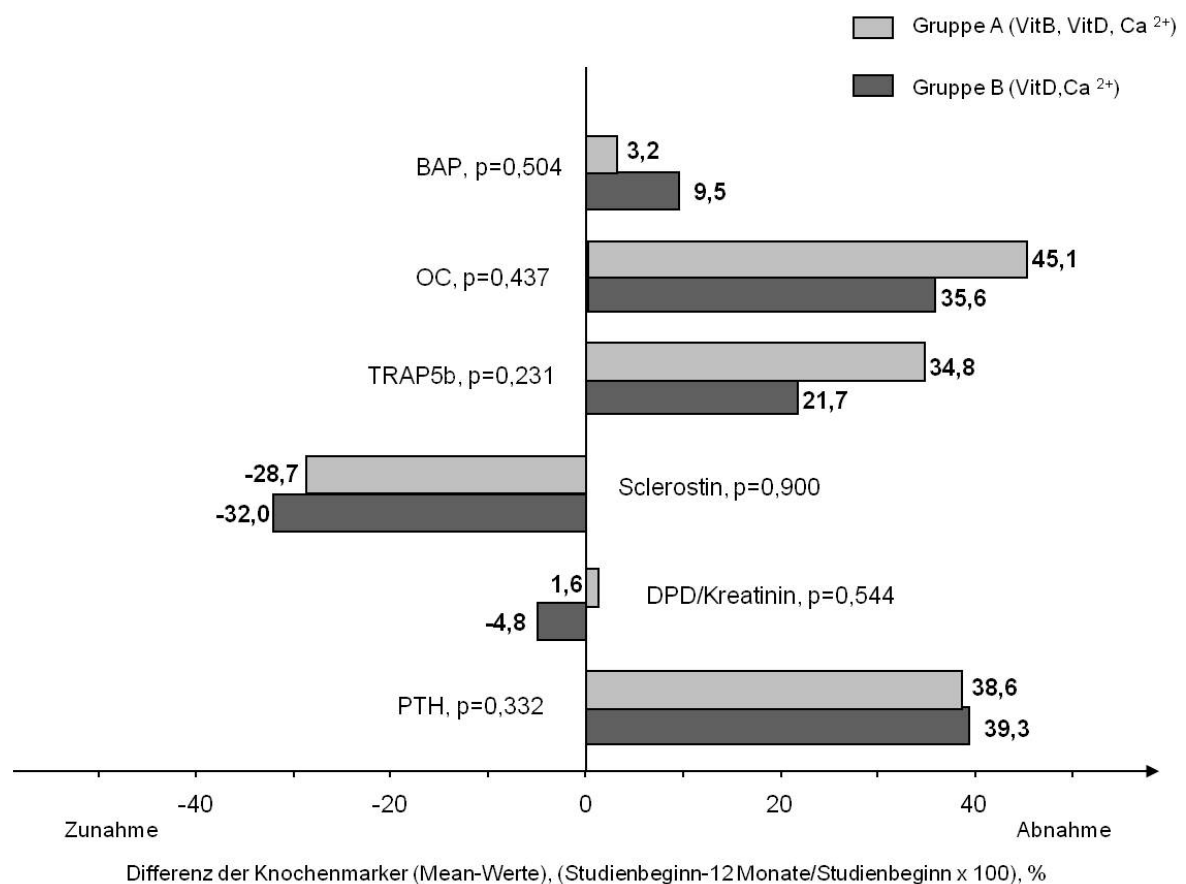


Abbildung 10: Prozentuale Veränderung der Knochenmarker (Mean-Werte) von Studienbeginn bis 12 Monate; p-Werte nach Mann-Whitney-U Test (Gruppe A versus Gruppe B) (87).

### **3.4 Korrelation verschiedener Parameter**

Wie von der Arbeitsgruppe Herrmann et al. (87) publiziert, fanden sich zu Studienbeginn bei allen Studienteilnehmern inverse Korrelationen zwischen VitD und PTH ( $R = -0,486$ ) und zwischen PTH und DPD ( $R = -0,280$ ). Die Konzentrationen der Knochenaufbaumarker OC ( $R = 0,417$ ) und BAP ( $R = 0,565$ ) korrelierten signifikant ( $p < 0,001$ ) mit der Konzentration des Knochenabbaumarkers TRAP5b.

Nach Abschluss des Studienzeitraums korrelierte in Gruppe A BAP signifikant mit dem Knochenabbaumarker DPD ( $R = 0,450$ ). Darüberhinaus korrelierten tHcy (Gruppe A;  $R = 0,366$ ), SAH [Gruppe A ( $R = 0,352$ )] und SAM (Gruppe A;  $R = 0,386$ ) mit SCL. In Gruppe A korrelierte MMA mit VitB<sub>12</sub> ( $R = 0,345$ ;  $p = 0,046$ ) (87).

## 4. Diskussion

OSP ist eine ubiquitär verbreitete, altersassoziierte Erkrankung (36). Menschen mit OSP weisen charakteristische Merkmale, wie z.B. eine reduzierte Knochenmasse und Störungen der ossären Mikroarchitektur auf, welche zu einem deutlich erhöhten Frakturrisiko führen (36;147). Als Prävention der OSP werden ausreichend Bewegung/Sport und die Einnahme von VitD und  $\text{Ca}^{2+}$  empfohlen (48;178). Aufgrund der nach wie vor hohen Prävalenz der OSP und osteoporotisch bedingter Frakturen, die immense Kosten für das Gesundheitssystem produzieren (68;120), ist es sinnvoll, nach zusätzlichen Möglichkeiten der Prävention zu suchen. In unserer Studie untersuchten wir 111 ältere Teilnehmer zwischen 54 und 85 Jahren von denen 65 die Studie nach 12 Monaten abschlossen. Wir untersuchten, inwieweit eine Supplementation mit B-Vitaminen, verbunden mit einer VitD- und  $\text{Ca}^{2+}$ -Supplementation, einen zusätzlichen positiven Effekt auf den Knochenstoffwechsel ausübt. Dafür haben wir zu Studienbeginn und nach 12 Monaten allgemeine Parameter, VitD, PTH, B-Vitamine und verschiedene Knochenmarker getestet. Die Daten der Parameter, die wir auch nach 6 Monaten testeten, fließen lediglich bei besonderer Relevanz in die Diskussion mit ein.

### ***Zusammenspiel von Vitamin D, Kalzium und Parathormon***

Über den Zusammenhang zwischen niedrigen VitD-Spiegeln und einer Erhöhung des Frakturrisikos herrscht mittlerweile Konsens (12;27). Ein chronischer VitD-Mangel hat einen chronischen sekundären Hyperparathyreoidismus zur Folge, der den Knochenabbau des älteren Menschen fördert (133;154). PTH wirkt systemisch und bewirkt zusammen mit VitD eine rasche Anhebung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegel im Plasma. PTH induziert eine Steigerung der renalen  $\text{Ca}^{2+}$ -Reabsorption, stimuliert die renale 25-Hydroxyvitamin D-1-alpha-Hydroxylase und induziert die Knochenresorption. Die regelmäßige Versorgung mit VitD resultierte in früheren Studien in einer Abnahme der PTH-Plasmaspiegel und einer Zunahme der BMD (133). Die günstigen Effekte einer VitD Supplementation auf den Knochenstoffwechsel werden der Unterdrückung des sekundären Hyperparathyreoidismus zugeordnet (14).

In unserer Studie lag der mediane VitD-Spiegel zu Studienbeginn unterhalb des optimalen Serumwerts von >30 ng/ml. Bei den meisten Teilnehmern wurden die VitD-Spiegel im

Verlauf unserer Studie durch Supplementation von 456 mg  $\text{Ca}^{2+}$  und 1200 IE VitD signifikant gesteigert ( $p < 0,001$ ) (Tabelle 16).

Zahlreiche klinische Studien demonstrieren eine suffiziente Steigerung der VitD-Spiegel durch orale Supplementation von VitD (25;178). Dies bestätigen auch Ooms et al., die in einer placebokontrollierten randomisierten Studie 348 Frauen (Alter >70 Jahre) mit 400 IE VitD pro Tag supplementierten und eine signifikante Steigerung der VitD-Spiegel auf klinisch wünschenswerte Spiegel beobachteten (161). Eine Supplementation von 456 mg  $\text{Ca}^{2+}$  und 1200 IE VitD erscheint somit ausreichend, um die VitD-Spiegel effektiv bei den meisten Probanden aus dem Mangelbereich in den Bereich der ausreichenden Werte (VitD-Spiegel von >30 ng/ml) anzuheben.

Unsere Studie ergab auch eine Reversibilität des sekundären Hyperparathyreoidismus bei täglicher Supplementation von 1200 IE VitD. Der Effekt des supplementierten VitD auf die PTH-Plasmaspiegel war bereits nach 6 Monaten signifikant. Nach weiteren 6 Monaten konnten wir kein weiteres nennenswertes Absinken der PTH-Plasmaspiegel beobachten. Eine tägliche Supplementation von 1200 IE VitD führte dazu, dass die PTH-Spiegel bei allen Probanden unserer Studie signifikant sanken (Tabelle 19), was auch schon Leidig-Bruckner et al. und Bjorkman et al. in anderen Studien beschrieben haben (14;127). McKane et al. (141) beobachtete bei alleiniger Gabe von hochdosiertem  $\text{Ca}^{2+}$  (2400 mg/Tag) bei älteren Frauen in einem Zeitraum von 3 Jahren eine signifikante Abnahme der PTH-Serumspiegel. Eine Reversibilität des sekundären Hyperparathyreoidismus ist durch Supplementation von VitD und  $\text{Ca}^{2+}$  möglich.

### ***Zusammenspiel von Vitamin D, Parathormon und Knochenmarkern***

Jüngste Ergebnisse zeigen, dass eine frühe und schnelle Anzeige eines gestörten Gleichgewichts im Knochenstoffwechsel durch die Bestimmung spezifischer Parameter, sogenannter Knochenmarker, in Serum und Urin möglich ist (54). Ebenso kann auch eine positive Beeinflussung des Knochenstoffwechsels (z.B. durch Supplementation von VitD) durch die Messung dieser Marker früh dargestellt werden.

Die Veränderungen der Knochenaufbaumarker waren in unserer Studie in beiden Gruppen vergleichbar, unabhängig von der VitB Supplementation. Der Einfluss der VitD-Supplementation auf den Knochenstoffwechsel war in unserer Studie bereits nach 6 Monaten signifikant.

Die BAP-Konzentrationen sanken in unserer Studie in beiden Gruppen bereits nach 6 Monaten signifikant. In den weiteren 6 Monaten unserer Studie konnten wir kein nennenswertes weiteres Absinken der BAP-Spiegel feststellen.

Unser Ergebnis ist kongruent mit den Beobachtungen von Spolidorio et al. (195), der eine negative Korrelation von BAP in Bezug auf die Knochenqualität beschreibt. Durch die Gabe von VitD wird die Knochenqualität verbessert und die BAP-Werte sinken. In der Studie von Spolidorio et al. (195) wurde allerdings zusätzlich zum VitD noch Calcitonin supplementiert.

In unserer Studie beobachteten wir eine verzögerte Reaktion der OC-Konzentrationen bei unseren Probanden. Ein signifikantes Absinken der Spiegel konnten wir noch nicht nach 6 Monaten, sondern erst nach 12 Monaten beobachten. Im Unterschied zu unserem Ergebnis beobachteten andere Studien keine Beeinflussung der OC-Konzentrationen durch VitD-Supplementation. In einer früheren Studie an Kindern unter vegetarischer Diät zeigte eine Supplementation von 400 IE VitD und 500 mg  $\text{Ca}^{2+}$  über einen Zeitraum von 4 Monaten keine signifikanten Veränderungen des Aufbaumarkers OC oder des Abbaumarkers TRAP5b (4). Ooms et al. beobachteten in einer placebo-kontrollierten Studie an 348 älteren Frauen mit einer VitD-Supplementation von 400 IE/d eine signifikante Abnahme des PTH jedoch keine Veränderung des OC Serumspiegels nach 2 Jahren (161). Die täglich supplementierte Dosis VitD betrug in diesen Studien jedoch nur rund ein Drittel der Menge, die wir substituierten (400 IE im Gegensatz zu 1200 IE).

Die Kombination von VitD mit  $\text{Ca}^{2+}$  hat möglicherweise auch einen noch höheren suppressiven Effekt auf den Knochenstoffwechsel. Eine sechswöchige Kur mit 1000 IE VitD und 1500 mg  $\text{Ca}^{2+}$  pro Tag bewirkte bei älteren Frauen eine Abnahme des OC Serumspiegel um 20%, eine Abnahme des N-Telopeptid im Urin um 50% und eine Abnahme des BAP um 10% (170). Dies deckt sich mit dem Ergebnis unserer Studie, in der eine tägliche Supplementation von 1200 IE VitD und 456 mg  $\text{Ca}^{2+}$  über ein Jahr eine Abnahme der Spiegel des Knochenaufbaumarkers OC von 45,1% in Gruppe A und 35,6% in Gruppe B bewirkte. Die Abnahme der Spiegel des Knochenaufbaumarkers OC deutet auf eine generelle Verlangsamung des Knochenabbaus durch die Suppletionsmaßnahmen in unserer Studie hin, die dann auch eine Verlangsamung des Knochenaufbaus nach sich zieht.

Die Knochenabbaumarker TRAP5b und DPD zeigten in unserer Studie nach 6 Monaten in beiden Gruppen keine signifikanten Veränderungen. Lediglich TRAP5b zeigte sich nach 12 Monaten signifikant erniedrigt (Tabelle 19). Die Serumkonzentration von TRAP5b sank innerhalb von 12 Monaten in Gruppe A um 2% und in Gruppe B um 31% ( $p < 0,001$ ) (Abbildung 10).

TRAP5b besitzt eine hohe Sensitivität und Spezifität für die Osteoklastenaktivität. Irie et al. (98) beschreibt TRAP5b als prognostischen Faktor für die BMD postmenopausaler Frauen und beobachtete eine positive Korrelation zwischen TRAP5b und BAP. Dies ist kongruent zu unserer Beobachtung, dass zu Studienbeginn TRAP5b und BAP positiv miteinander korrelierten. Spolidorio et al. beschreibt ebenso eine positive Korrelation zwischen TRAP5b bzw. BAP in Bezug auf die Knochenqualität. Durch die Gabe von VitD (bei Spolidorio et al. auch zuzüglich Calcitonin) wurde die Knochenqualität verbessert und die TRAP5b- und BAP-Werte sanken (195). Dazu kongruent zeigt eine Studie von Reichel et al. eine gute Korrelation zwischen intaktem PTH und TRAP5b (174).

Nur TRAP5b jedoch nicht DPD wurden in unserer Studie durch eine 12 monatige Supplementation von VitD in Gruppe B signifikant gesenkt (87). McKane et al. (141) beobachtete bei alleiniger Gabe von hochdosiertem  $\text{Ca}^{2+}$  (2400 mg/Tag) bei älteren Frauen in einem Zeitraum von 3 Jahren eine signifikante Abnahme der PTH-Serumspiegel und der Werte von DPD im Urin.

SCL wird von Osteozyten sezerniert und ist Mitglied der DAN Familie (differential screening-selected aberrative in neuroblastoma). SCL antagonisiert das Bone Morphogenetic Protein und/oder das Wingless-Protein, welche die Wingless-Int-1-Signalkaskade blockieren (152). Die Osteoblasten werden in Aktivität und Differenzierung gehemmt und in ihrer Apoptose gefördert. Die Serumkonzentration von SCL stieg im Beobachtungszeitraum in Gruppe A um 37% ( $p < 0,001$ ) und in Gruppe B um 25% ( $p = 0,002$ ). Die Beobachtung, dass SCL, ein Marker des Knochenabbaus, in beiden Gruppen stieg, war für uns überraschend, unterstützt jedoch die Aussagen von Cejka et al. (29), die, wider Erwarten, eine positive Korrelation zwischen SCL und BMD bzw. Knochenvolumen beobachteten.

PTH hemmt die Sezernierung von SCL. Entsprechend bewirkte eine Senkung der PTH Spiegel durch Supplementierung von VitD in unserer Studie eine Zunahme der SCL-Plasmaspiegel. Studien, die den Einfluss einer VitD-Supplementierung auf SCL beschreiben, sind derzeit nicht verfügbar. Lediglich Mirza et al. beschrieb eine negative Korrelation zwischen SCL und PTH in einer Studie mit postmenopausalen Frauen (149). Eine weitere Studie zeigte sinkende SCL-Spiegel nach einer 18 monatigen Behandlung mit PTH (167). In einer anderen Studie an postmenopausalen Frauen berichtet Gatti et al. von einer Abnahme des SCL um nahezu 30% nach 36 Monaten Behandlung mit monoklonalen Antikörpern gegen den Liganden des Rezeptor-Aktivator-NF-Kappa-B (56). Diese Ergebnisse legen gemeinsam den Schluss nahe, dass bei VitD-Mangel der anabole Effekt durch das steigende PTH verstärkt wird, welches wiederum den SCL-Spiegel senkt. Im Kontrast dazu steht die Verlangsamung des Knochenstoffwechsels, die durch supplementiertes VitD respektive sinkendes PTH vermittelt wird (133).



Das Ausmaß der PTH-Senkung scheint die nachfolgenden Änderungen der Knochenmarker zu lenken. In einer Studie an älteren bettlägerigen Patienten mit VitD-Defizit resultierte eine Supplementation von 400 oder 1200 IE VitD und 500 mg  $\text{Ca}^{2+}$  über 6 Monate in einer Zunahme der VitD-Serumkonzentration um 124-200%, lediglich 7-8% Abnahme des PTH und nahezu keiner Veränderung des Knochenaufbaumarker PINP (amino-terminal telopeptide of type I collagen) oder des Knochenabbaumarkers ICTP (carboxy-terminal telopeptide of type I collagen) (14). Die Unterschiede zwischen den Studien sind möglicherweise in den verschiedenen Dosierungen des VitD, der Dauer der Supplementation und spezifischen Unterschieden in Bezug auf Wachstumsphasen oder osteoporotische Veränderungen bei älteren Menschen begründet.

Dieses Ergebnis legt die Vermutung nahe, dass der Effekt der VitD-Supplementation die stärkste Einflussgröße in Bezug auf das Maß des Knochenaufbaus darstellt. Wo eine Verlangsamung des Knochenstoffwechsels geschieht, geht damit zuerst eine Abnahme der Knochenabbaumarker (PTH, TRAP5b), langfristig jedoch auch eine verzögerte und weniger akzentuierte Abnahme der Knochenaufbaumarker (BAP und OC) einher. Unsere Daten zeigen, dass die Supplementation von VitD mit oder ohne zusätzliche B-Vitamin-Supplementation einen positiven Effekt auf den Knochenaufbau hat. Eine Supplementation mit VitD und  $\text{Ca}^{2+}$  sollte man langfristig empfehlen.

### ***B-Vitamine und ihr Zusammenspiel mit Knochenmarkern***

Der Einfluss der B-Vitamine auf den Knochenstoffwechsel ist weniger offensichtlich. HHcy und niedrige VitB-Spiegel beeinflussen den Knochenstoffwechsel direkt über Stimulation der Osteoklastenaktivität wohingegen die Aktivität der Osteoblasten kaum beeinflusst wird (72;77;80;82;162). Interventionelle Langzeitstudien können die Bedeutung einer Supplementation mit B-Vitaminen auf den Knochenstoffwechsel erhellen. Nur wenige Studien testeten bisher die Auswirkungen einer Supplementation mit B-Vitaminen auf Marker des Knochenauf- und -abbaus (74). Die Messung des VitB<sub>12</sub>-Status gibt Aufschluss darüber, ob ein VitB<sub>12</sub>-Mangel vorliegt. Die Messung von holoTC und MMA erlaubt die Unterscheidung, ob die Speicherung von VitB<sub>12</sub> gestört ist oder ob ein funktioneller Mangel vorliegt (90).

In unserer Gruppe A (mit B-Vitamin-Supplementation) stieg der VitB<sub>12</sub>-Spiegel im Beobachtungszeitraum im Mittel signifikant an ( $p < 0,001$ ). Die MMA-Plasmakonzentration sank in der Vitamingruppe deutlich, jedoch nicht signifikant. In Gruppe B konnten wir ein

leichtes Absinken des VitB<sub>12</sub>-Spiegels feststellen. Der MMA-Spiegel stieg in Gruppe B deutlich, jedoch nicht signifikant.

In verschiedenen Studien wurde eine Supplementation von VitB<sub>12</sub> in verschiedenen Dosierungen untersucht. Bei einer Supplementation von 500 µg VitB<sub>12</sub> wurde im Vergleich verschiedener Studien im Mittel eine Erhöhung des VitB<sub>12</sub>-Spiegels zwischen 91 und 170 pmol/l beobachtet (46). In unserer Studie beobachteten wir ebenfalls einen Anstieg der VitB<sub>12</sub>-Spiegel (148 pmol/l), bei der Supplementationsdosis von 500 µg und dem Supplementationzeitraum von 12 Monaten wäre jedoch ein stärkerer Anstieg der VitB<sub>12</sub>-Spiegel zu erwarten gewesen. Durch den Ausgleich des VitB<sub>12</sub>-Defizits konnte der Abbau von D-Methylmalonyl-CoA über L-Methylmalonyl-CoA zu Succinyl-CoA mit Hilfe der VitB<sub>12</sub>-abhängigen Transferase wieder verstärkt ablaufen (Abbildung 4). Durch die Begünstigung dieses Abbauwegs konnte der alternative Abbauweg des D-Methylmalonyl-CoA zu MMA reduziert werden, was die sinkenden MMA-Spiegel in der Vitamingruppe erklärt. Für die Gruppe B gilt im Umkehrschluss, dass durch Hemmung der VitB<sub>12</sub>-abhängigen Transferase, und einen damit einhergehenden Rückstau, D-Methylmalonyl-CoA verstärkt zu MMA abgebaut wurde, weshalb die MMA-Spiegel in Gruppe B stiegen.

Wir vermuten, dass durch die Einnahme von Kalziumkarbonat die Resorption von VitB<sub>12</sub> gestört wird. Das Kalziumkarbonat bewirkt im Magen und Duodenum eine Erhöhung des pH-Werts, welche die Resorption von VitB<sub>12</sub> hemmt. Die Tatsache, dass die MMA-Serumspiegel in beiden Gruppen zwischen Studienbeginn und 6 Monaten schwach stiegen, ist ein Hinweis auf diese gestörte Resorption. In Gruppe A wurde durch die langfristige Einnahme von VitB<sub>12</sub> jedoch zwischen Studienbeginn und 12 Monaten eine Senkung der MMA-Serumspiegel erreicht (Tabelle 18). Diese Senkung war nicht signifikant, wurde aber vermutlich durch die Einnahme von Kalziumkarbonat gebremst. Quesada et al. beobachtet in einer Studie, dass die Resorption von Kalziumcitrat effektiver ist im Vergleich zu Kalziumlactogluconat oder Kalziumkarbonat (173). Die Auswirkungen einer Supplementation von VitB<sub>12</sub> zusätzlich zu Kalziumcitrat oder Kalziumlactogluconat muss in weiteren Studien untersucht werden.

Diese Ergebnisse zeigen, dass eine Supplementation mit VitB<sub>12</sub> zusätzlich zu VitD und Ca<sup>2+</sup> zu einer signifikanten Erhöhung der VitB<sub>12</sub>-Spiegel bei den entsprechenden Studienteilnehmern führte. Als Koenzym der MS ist VitB<sub>12</sub> entscheidend an einer Umwandlung von Hcy in Meth beteiligt und eine gute VitB<sub>12</sub>-Versorgung Voraussetzung für sinkende tHcy-Spiegel (Abbildung 4).

Ein Folatmangel ist jedoch mit Abstand die bedeutendste Ursache einer HHcy. Der häufigste Vitaminmangel in Europa ist der Folatmangel. Das Folat im Serum ist nur ein kurzfristiger Marker, der von der Nahrungsaufnahme der letzten 2-3 Wochen beeinflusst

wird. Der Folatmangel wird begünstigt durch einen Mangel an frischem Obst und Gemüse und die Verarbeitungsmethoden von Getreideprodukten (83).

In unserer Teilnehmerpopulation wies kein Teilnehmer einen Folatmangel auf. Die Gesamtfolat-Konzentration erhöhte sich durch die Supplementation von 500 µg Folsäure in unserer Studie in Gruppe A signifikant ( $p < 0,001$ ). In Gruppe B sank die Gesamtfolat-Konzentration leicht ab. Die medianen Konzentrationen des tHcy in der Gruppe A sanken innerhalb von 12 Monaten um 25%.

Eine Studie von Pizzolo et al. weist darauf hin, dass durch Folsäuresupplementation eine signifikante Senkung des tHcy-Spiegels ( $p < 0,001$ ) erreicht wurde (169). Eine Studie von Tighe et al. untersuchte den Effekt verschiedener Folsäuredosierungen auf die tHcy-Konzentration über ein halbes Jahr hinweg. Das Ausmaß der Senkung hing jeweils von den Ausgangskonzentrationen von tHcy im Serum ab. Bei Probanden mit hohen Ausgangswerten, wurde der tHcy-Spiegel besonders effektiv gesenkt: bei einer Supplementation von 800 µg Folsäure pro Tag um fast 30%. Bei niedrigeren Basalwerten für tHcy fällt die Senkung durch Folsäuresupplementation geringer aus. Bei täglicher Folsäure-Supplementation von 20-500 µg ist im Mittel eine Senkung der tHcy-Spiegel von 16-39% zu erwarten (200). Unsere beobachtete Senkung des tHcy-Spiegels in der B-Vitaminsupplementierten Gruppe lagen mit im Mittel 25% also im Rahmen der Erwartungen.

Eine Supplementation von Folsäure zusätzlich zu VitD und  $\text{Ca}^{2+}$  führte zu einer signifikanten Erhöhung der Gesamtfolat-Spiegel bei den entsprechenden Studienteilnehmern. Die Supplementation mit VitB<sub>12</sub> und Folsäure führte zu einem signifikanten Absinken der tHcy-Spiegel.

SAM ist wichtigster Methylgruppen-donator zellulärer Reaktionen in lebenden Organismen. Zu den wichtigsten Abnehmern der Methylgruppen von SAM gehören die Kreatin-Synthese (liefert bis zu 75% des im Organismus anfallenden tHcy) und die Methylierung von Nukleinsäuren (Cytosin) der DNA. SAM überträgt seine Methylgruppe leicht (Transmethylierung) und wird zu SAH demethyliert. Interessanterweise korrelierte nicht tHcy, sondern SAH und SAM zu Beginn unserer Studie signifikant mit BAP, SCL und PTH. Bei SAH und SAM konnten wir weder innerhalb einer Gruppe A oder B über den Zeitraum von 12 Monaten noch im Vergleich zwischen den Gruppen A und B eine signifikante Änderung beschreiben. Dies lässt vermuten, dass SAH mehr noch als tHcy mit dem aktiven Knochenstoffwechsel in Beziehung steht. Eine aktuelle Studie von Enneman et al. untersucht den Einfluss von tHcy, SAH und SAM auf die Knochenstabilität über die Methylierungskapazität (47). Eine Korrelation zwischen den SAM-, SAH-Spiegeln, dem SAM/SAH-Quotienten und dem Frakturrisiko konnten Enneman et al. nicht

beschreiben. Aktuelle Studien von Pizzolo et al. weisen darauf hin, dass durch Folsäuresupplementation eine Senkung des tHcy-Spiegels ( $p < 0,001$ ) und gleichzeitig eine Steigerung der SAM-Spiegel und des SAM/SAH-Quotienten ( $p < 0,05$ ) erreicht werden konnte (169). Green et al. hingegen beobachtet in einer Studie, dass SAH von einer B-Vitamin-Supplementation und der damit einhergehenden tHcy Senkung gänzlich unbeeinflusst bleibt ((64). Diese Beobachtungen untermauern die Annahme, dass SAH eventuell vom Folatstatus unabhängig ist. Diese Studienergebnisse passen zu unserer Beobachtung, dass sich in unserer Studie selbst in der Vitamin-supplementierten Gruppe, deren tHcy-Spiegel signifikant sanken ( $p < 0,001$ ), die SAH/SAM Werte kaum veränderten. Studien zur Auswirkung hoher tHcy-Plasmaspiegel auf kardiovaskuläre Ereignisse bestätigen ebenfalls diese Beobachtung. Kerins et al. (110) zeigten, dass SAH ein sensitiverer Marker für kardiovaskuläre Ereignisse darstellt, als tHcy. Bona et al. (19) zeigten, dass Patienten, die nach einem Myokardinfarkt durch B-Vitamine ihr tHcy senkten, keine Risikoreduktion in Bezug auf ein erneutes Infarktgeschehen zu erwarten hatten.

In unserer Studie veränderten sich, selbst in der B-Vitaminsupplementierten Gruppe, deren tHcy-Spiegel signifikant sanken ( $p < 0,001$ ), die SAH/SAM Werte kaum. Weitere Studien sind nötig, um den Einfluss von SAM und SAH auf den Knochenstoffwechsel, unabhängig vom tHcy-Status, zu erhellen.

Siebzig Prozent unserer Probanden startete mit einer moderaten HHcy (Tabelle 10) in unsere Studie. Die medianen Konzentrationen des tHcy in der Gruppe A sanken innerhalb von 12 Monaten von 12,6 auf 9,1  $\mu\text{mol/l}$  (Tabelle 18). Die medianen Konzentrationen des tHcy in der Gruppe B (erhielt nur VitD und  $\text{Ca}^{2+}$ ) stiegen innerhalb von 12 Monaten im Mittel von 12,5 auf 14,9  $\mu\text{mol/l}$  (Tabelle 18). In unserer Studie zeigten sich bei Gabe von B-Vitaminen zusätzlich zur VitD- und  $\text{Ca}^{2+}$ -Supplementation keine weiteren Änderungen der von uns gemessenen Knochenmarker.

Studien beobachteten eine 2-4fache Zunahme osteoporotischer Frakturen bei Individuen mit hohen Plasma-tHcy-Spiegeln (60;143;207). Hohe tHcy-Spiegel steigern *in vitro* die Aktivität der Osteoklasten (80). Unsere Resultate sind kongruent mit denen früherer klinischer Studien, in denen kein weiterer Effekt der B-Vitamine (1 bzw. 2,5 mg Folsäure, 0,5 mg VitB<sub>12</sub> und 10 bzw. 25 mg VitB<sub>6</sub>) auf den Knochenstoffwechsel nach 1 bzw. 2 Jahren beobachtet werden konnte (63;78). Dies bestätigen auch die Ergebnisse von Green et.al. (63), die 276 ältere Personen über 2 Jahre mit B-Vitaminen behandelte und im Vergleich zur Placebogruppe keine signifikante Änderung bei den Knochenmarkern BAP und Knochenkollagenfragmenten fand. Der tHcy-Spiegel wurde in unserer Studie bei der Vitamingruppe signifikant gesenkt, die BAP-Spiegel blieben unbeeinflusst. Dies spricht gegen einen direkten Zusammenhang zwischen der Höhe des tHcy-Spiegels und

dem Knochenmarker BAP. Einen direkten Zusammenhang zwischen der Höhe des tHcy-Spiegels und Knochenstoffwechselfparametern konnten wir in unserer Studie nicht zeigen. Eine aktuelle Studie von Keser et al. aus Kroatien untersuchte die Entwicklung der HHcy in bezug auf den Knochenstoffwechsel durch Supplementation von Folsäure und VitB<sub>12</sub> an 31 postmenopausalen Frauen über einen Zeitraum von 4 Monaten und konnte keinen Benefit für den Knochenstoffwechsel feststellen (111). Die Studie war jedoch klein und der Zeitraum kurz, weshalb die Aussagekraft in Frage zu stellen ist.

Einige Autoren berichten jedoch von signifikanten Korrelationen zwischen tHcy-Spiegeln und Knochenresorptionsmarkern (43;57;73). Individuen mit tHcy Werten >15 µmol/l zeigten nach Behandlung mit B-Vitaminen jedoch eine Zunahme der BMD der Lendenwirbelsäule und eine Abnahme der OC- und PINP-Konzentration um fast 50% (78). Darüberhinaus wurde festgestellt, dass tHcy im Knochen über Kollagenbindungen kumuliert. HHcy scheint ungünstige Auswirkungen auf die extrazelluläre Knochenmatrix zu haben, indem es die Vernetzung der Kollagene stört (76;94). Es wird beschrieben, dass ein Vitamin B-Defizit mit einer Verringerung der enzymatischen Vernetzung und einer Vermehrung der nicht-enzymatischen Vernetzung im menschlichen Knochen in Verbindung steht (182). Folglich suggerieren die existierenden Daten eine negative Auswirkung von HHcy und Vitamin B-Mangel auf die Knochenqualität vermittelt durch eine Stimulation der Knochenresorption und eine Störung der Kollagenvernetzung.

Eine große, doppelblinde und placebokontrollierte klinische Studie von Sato et al. an 628 Apoplexpatienten ergab nach zweijähriger Vitamin B-Supplementation eine Reduktion des Frakturrisikos am Schenkelhals um 75% (185). Dieses Ergebnis steht im Kontrast zu dem Ergebnis unserer Studie, bei der die Supplementation mit VitD, Ca<sup>2+</sup> und B-Vit über ein Jahr keinen Benefit gegenüber einer reinen Supplementation mit VitD und Ca<sup>2+</sup> ergab. Allerdings wiesen die Probanden der Studie von Sato et al. zu Beginn der Studie hohe tHcy-Spiegel auf (19,9 µmol/l). Es mag hier einen Unterschied geben, ob das untersuchte Subjekt zu Studienbeginn HHcy aufweist oder moderat erhöhte tHcy-Spiegel. Dafür ergeben sich Hinweise aus den Studien von Green et al. (63) und Herrmann et al. (75).

In unserer Studie starteten die Teilnehmer zu Studienbeginn mit einem moderat erhöhten tHcy-Spiegel. In der Gruppe A konnten durch B-Vitamin-Supplementation die tHcy-Spiegel signifikant gesenkt werden. In jüngster Zeit wurde ein hoher tHcy-Spiegel als unabhängiger Risikofaktor für OSP und osteoporotische Frakturen entdeckt (81;143;207). Eine positive Beeinflussung des Knochenstoffwechsels, repräsentiert durch die von uns gemessenen Knochenmarker, durch diese Senkung der tHcy-Spiegel konnten wir nicht feststellen. Da ein hoher tHcy-Spiegel mit Krankheiten wie Atherosklerose, kardiovaskuläre Erkrankungen, kognitiven Dysfunktionen, Demenz und OSP assoziiert wird (83), ist eine Senkung des tHcy-Spiegels jedoch in vielfältiger Hinsicht positiv zu werten.

### ***Limitation der Studie***

Da über 45% unserer Teilnehmer die Studie vorzeitig abbrachen, war unsere Studienstichprobe relativ klein, wodurch die statistische Power unserer Daten reduziert wird. Deshalb müssen alle Ergebnisse mit Vorsicht interpretiert werden. Es ist für folgende Studien empfehlenswert, den Sachverhalt an einer deutlich größeren Stichprobe zu untersuchen. Wenn man die Studie länger hätte laufen lassen, hätten sich evtl. deutlichere Tendenzen gezeigt, dass eine Senkung des tHcy-Spiegels durch Einnahme von B-Vit auch positive Auswirkung auf den Knochenstoffwechsel hat.

Die regelmäßige Versorgung mit VitD resultierte in früheren Studien in einer Abnahme der PTH-Plasmaspiegel und einer Zunahme der BMD (133). Wir haben die BMD nicht gemessen, da innerhalb eines Untersuchungszeitraums von nur 12 Monaten keine Veränderungen des Knochens über die DXA-Methode messbar sind.

## **Zusammenschau**

1. Die Supplementation von VitD und  $\text{Ca}^{2+}$  in Kombination mit B-Vitaminen (Gruppe A) oder ohne B-Vitamine (Gruppe B) führte in beiden Gruppen zu einer signifikanten und nahezu vergleichbaren Reduktion des Knochenstoffwechsels, sowohl in Bezug auf den Knochenauf- als auch den Knochenabbau.
2. Desweiteren haben wir durch tägliche Supplementation von 1200 IE VitD die Erhöhung des PTH und damit den sekundären Hyperparathyreoidismus korrigiert. Die Abnahme der PTH- und BAP-Konzentrationen konnten wir nach 6 Monaten, die Abnahme der OC- und TRAP5b-Konzentration nach 12 Monaten beobachten.
3. In Bezug auf die Knochenmarker haben wir keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Gruppen gefunden.
4. In unserer Studie haben wir die moderate HHcy unserer Probanden durch die Supplementation von 500 µg Folsäure, 500 µg VitB<sub>12</sub> und 50 mg VitB<sub>6</sub> korrigiert.
5. Die von uns beobachtete Senkung des tHcy durch B-Vitamin-Supplementation zeigt, besonders bei Individuen mit starker HHcy, die Tendenz, das „cross-linking“ des Knochenkollagens positiv zu beeinflussen und dadurch die Knochenfestigkeit zu erhöhen. Dies zu untersuchen bleibt zukünftigen Studien überlassen.

## 5. Referenzen

1. Adluri RS, Zhan L, Bagchi M, Maulik N, Maulik G. Comparative effects of a novel plant-based calcium supplement with two common calcium salts on proliferation and mineralization in human osteoblast cells. *Mol Cell Biochem* 2010;340:73-80.
2. Als OS, Gotfredsen A, Christiansen C. The effect of glucocorticoids on bone mass in rheumatoid arthritis patients. Influence of menopausal state. *Arthritis Rheum* 1985;28:369-75.
3. Altman RD, Latta LL, Keer R, Renfree K, Hornicek FJ, Banovac K. Effect of nonsteroidal antiinflammatory drugs on fracture healing: a laboratory study in rats. *J Orthop Trauma* 1995;9:392-400.
4. Ambroszkiewicz J, Klemarczyk W, Gajewska J, Chelchowska M, Strucinska M, Oltarzewski M, Laskowska-Klita T. [Effect of vitamin D supplementation on serum 25-hydroxyvitamin D and bone turnover markers concentrations in vegetarian children]. *Med Wieku Rozwoj* 2009;13:34-9.
5. Amital H, Szekanecz Z, Szucs G, Danko K, Nagy E, Csepány T et al. Serum concentrations of 25-OH vitamin D in patients with systemic lupus erythematosus (SLE) are inversely related to disease activity: is it time to routinely supplement patients with SLE with vitamin D? *Ann Rheum Dis* 2010;69:1155-7.
6. Andres E. Signs and symptoms of vitamin B12 (cobalamin) deficiency: a critical review of the literature. In: Herrmann W, Obeid R, eds. *Vitamins in the Prevention of Human Diseases*. Berlin - New York: Walter de Gruyter, 2011:242-53.
7. Ascherio A, Munger KL, Simon KC. Vitamin D and multiple sclerosis. *Lancet Neurol* 2010;9:599-612.
8. Atkins GJ, Rowe PS, Lim HP, Welldon KJ, Ormsby R, Wijenayaka AR et al. Sclerostin is a locally acting regulator of late-osteoblast/pre-osteocyte differentiation and regulates mineralization through a MEPE-ASARM dependent mechanism. *J Bone Miner Res* 2011.
9. Bakhireva LN, Shainline MR, Carter S, Robinson S, Beaton SJ, Nawarskas JJ, Gunter MJ. Synergistic effect of statins and postmenopausal hormone therapy in the prevention of skeletal fractures in elderly women. *Pharmacotherapy* 2010;30:879-87.
10. Bässler KH, Golly I, Loew D, Pietrzik K. *Vitamin-Lexikon für Ärzte, Apotheker und Ernährungswissenschaftler*. München: Urban & Fischer, 2002.
11. Beerhorst K, Schouwenaars FM, Tan IY, Aldenkamp AP. Epilepsy: fractures and the role of cumulative antiepileptic drug load. *Acta Neurol Scand* 2011.
12. Bischoff-Ferrari HA, Dietrich T, Orav EJ, Dawson-Hughes B. Positive association between 25-hydroxy vitamin D levels and bone mineral density: a population-based study of younger and older adults. *Am J Med* 2004;116:634-9.
13. Bischoff-Ferrari HA, Dawson-Hughes B, Staehelin HB, Orav JE, Stuck AE, Theiler R et al. Fall prevention with supplemental and active forms of vitamin D: a meta-analysis of randomised controlled trials. *BMJ* 2009;339:b3692.



14. Bjorkman M, Sorva A, Risteli J, Tilvis R. Vitamin D supplementation has minor effects on parathyroid hormone and bone turnover markers in vitamin D-deficient bedridden older patients. *Age Ageing* 2008;37:25-31.
15. Blanton D, Han Z, Bierschenk L, Linga-Reddy MV, Wang H, Clare-Salzler M et al. Reduced Serum Vitamin D-Binding Protein Levels Are Associated With Type 1 Diabetes. *Diabetes* 2011.
16. Bliuc D, Nguyen ND, Milch VE, Nguyen TV, Eisman JA, Center JR. Mortality risk associated with low-trauma osteoporotic fracture and subsequent fracture in men and women. *JAMA* 2009;301:513-21.
17. Blume SW, Curtis JR. Medical costs of osteoporosis in the elderly Medicare population. *Osteoporos Int* 2010.
18. Bohnet JP, Fonda ML, Feldhoff RC. Identification of Lys190 as the primary binding site for pyridoxal 5'-phosphate in human serum albumin. *FEBS Lett* 1992;298:266-8.
19. Bonna KH, Njolstad I, Ueland PM, Schirmer H, Tverdal A, Steigen T et al. Homocysteine lowering and cardiovascular events after acute myocardial infarction. *N Engl J Med* 2006;354:1578-88.
20. Bone HG, Bolognese MA, Yuen CK, Kendler DL, Miller PD, Yang YC et al. Effects of denosumab treatment and discontinuation on bone mineral density and bone turnover markers in postmenopausal women with low bone mass. *J Clin Endocrinol Metab* 2011;96:972-80.
21. Boonen S, Adachi JD, Man Z, Cummings SR, Lippuner K, Topping O et al. Treatment with Denosumab Reduces the Incidence of New Vertebral and Hip Fractures in Postmenopausal Women at High Risk. *J Clin Endocrinol Metab* 2011.
22. Brady J, Wilson L, McGregor L, Valente E, Orning L. Active B12: a rapid, automated assay for holotranscobalamin on the Abbott AxSYM analyzer. *Clin Chem* 2008;54:567-73.
23. Brown JP, Prince RL, Deal C, Recker RR, Kiel DP, de Gregorio LH et al. Comparison of the effect of denosumab and alendronate on BMD and biochemical markers of bone turnover in postmenopausal women with low bone mass: a randomized, blinded, phase 3 trial. *J Bone Miner Res* 2009;24:153-61.
24. Burrows HJ, Graham G. Spinal Osteoporosis, Cause Unknown. *Ann Rheum Dis* 1947;6:129-45.
25. Cannell JJ, Hollis BW. Use of vitamin D in clinical practice. *Altern Med Rev* 2008;13:6-20.
26. Carmel R. Biomarkers of cobalamin (vitamin B-12) status in the epidemiologic setting: a critical overview of context, applications, and performance characteristics of cobalamin, methylmalonic acid, and holotranscobalamin II. *Am J Clin Nutr* 2011.
27. Cauley JA, Lacroix AZ, Wu L, Horwitz M, Danielson ME, Bauer DC et al. Serum 25-hydroxyvitamin D concentrations and risk for hip fractures. *Ann Intern Med* 2008;149:242-50.

28. Cawthon PM, Ensrud KE, Laughlin GA, Cauley JA, Dam TT, Barrett-Connor E et al. Sex hormones and frailty in older men: the osteoporotic fractures in men (MrOS) study. *J Clin Endocrinol Metab* 2009;94:3806-15.
29. Cejka D, Jager-Lansky A, Kieweg H, Weber M, Bieglmayer C, Haider DG et al. Sclerostin serum levels correlate positively with bone mineral density and microarchitecture in haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 2012;27:226-30.
30. Chrischilles E, Shireman T, Wallace R. Costs and health effects of osteoporotic fractures. *Bone* 1994;15:377-86.
31. Chun KJ. Bone densitometry. *Semin Nucl Med* 2011;41:220-8.
32. Clemens TL, Karsenty G. The osteoblast: An insulin target cell controlling glucose homeostasis. *J Bone Miner Res* 2011;26:677-80.
33. Colwell A, Russell RG, Eastell R. Factors affecting the assay of urinary 3-hydroxy pyridinium crosslinks of collagen as markers of bone resorption. *Eur J Clin Invest* 1993;23:341-9.
34. Cooper C, Cole ZA, Holroyd CR, Earl SC, Harvey NC, Dennison EM et al. Secular trends in the incidence of hip and other osteoporotic fractures. *Osteoporos Int* 2011;22:1277-88.
35. Cummings SR, Browner WS, Bauer D, Stone K, Ensrud K, Jamal S, Ettinger B. Endogenous hormones and the risk of hip and vertebral fractures among older women. Study of Osteoporotic Fractures Research Group. *N Engl J Med* 1998;339:733-8.
36. Cummings SR, Melton LJ. Epidemiology and outcomes of osteoporotic fractures. *Lancet* 2002;359:1761-7.
37. Cummings SR, San MJ, McClung MR, Siris ES, Eastell R, Reid IR et al. Denosumab for prevention of fractures in postmenopausal women with osteoporosis. *N Engl J Med* 2009;361:756-65.
38. de Bree A, van Dusseldorp M, Brouwer IA, van het Hof KH, Steegers-Theunissen RP. Folate intake in Europe: recommended, actual and desired intake. *Eur J Clin Nutr* 1997;51:643-60.
39. de Vries F, Cooper AL, Cockle SM, van Staa TP, Cooper C. Fracture risk in patients receiving acid-suppressant medication alone and in combination with bisphosphonates. *Osteoporos Int* 2009;20:1989-98.
40. Delmas PD. Biochemical markers of bone turnover for the clinical assessment of metabolic bone disease. *Endocrinol Metab Clin North Am* 1990;19:1-18.
41. Demontiero O, Herrmann M, Duque G. Supplementation with vitamin d and calcium in long-term care residents. *J Am Med Dir Assoc* 2011;12:190-4.
42. Deutsche Gesellschaft für Ernährung e.V. 12. Ernährungsbericht. 2012:40-85.
43. Dhonukshe-Rutten RA, Pluijm SM, de Groot LC, Lips P, Smit JH, van Staveren WA. Homocysteine and vitamin B12 status relate to bone turnover markers, broadband ultrasound attenuation, and fractures in healthy elderly people. *J Bone Miner Res* 2005;20:921-9.

44. di Munno O, Mazzantini M, Sinigaglia L, Bianchi G, Minisola G, Muratore M et al. Effect of low dose methotrexate on bone density in women with rheumatoid arthritis: results from a multicenter cross-sectional study. *J Rheumatol* 2004;31:1305-9.
45. Dobnig H, Pilz S, Scharnagl H, Renner W, Seelhorst U, Wellnitz B et al. Independent association of low serum 25-hydroxyvitamin d and 1,25-dihydroxyvitamin d levels with all-cause and cardiovascular mortality. *Arch Intern Med* 2008;168:1340-9.
46. Dullemeijer C, Souverein OW, Doets EL, Van d, V, van Wijngaarden JP, de Boer WJ et al. Systematic review with dose-response meta-analyses between vitamin B-12 intake and European Micronutrient Recommendations Aligned's prioritized biomarkers of vitamin B-12 including randomized controlled trials and observational studies in adults and elderly persons. *Am J Clin Nutr* 2013;97:390-402.
47. Enneman AW, Van d, V, de JR, Heil SG, Stolk L, Hofman A et al. The association between plasma homocysteine levels, methylation capacity and incident osteoporotic fractures. *Bone* 2012;50:1401-5.
48. Fassbender WJ, Stumpf UC. [DVO guideline 2006. What changes have there been in the diagnosis, prevention and treatment of osteoporosis?]. *Z Rheumatol* 2006;65:364-9.
49. Finkelstein JD. Metabolic regulatory properties of S-adenosylmethionine and S-adenosylhomocysteine. *Clin Chem Lab Med* 2007;45:1694-9.
50. Finkelstein JD. The metabolism of homocysteine: pathways and regulation. *Eur J Pediatr* 1998;157 Suppl 2:S40-S44.
51. Finkelstein JD. The metabolism of homocysteine: pathways and regulation. *Eur J Pediatr* 1998;157 Suppl 2:S40-S44.
52. Finkelstein JD. Methionine metabolism in mammals. *J Nutr Biochem* 1990;228-37.
53. Flynn A, Hirvonen T, Mensink GB, Ocke MC, Serra-Majem L, Stos K et al. Intake of selected nutrients from foods, from fortification and from supplements in various European countries. *Food Nutr Res* 2009;53.
54. Garnero P. Bone markers in osteoporosis. *Curr Osteoporos Rep* 2009;7:84-90.
55. Garnero P, Delmas PD. [Biochemical markers of bone turnover : clinical usefulness in osteoporosis]. *Ann Biol Clin (Paris)* 1999;57:137-48.
56. Gatti D, Viapiana O, Fracassi E, Idolazzi L, Dartizio C, Povino MR et al. Sclerostin and DKK1 in postmenopausal osteoporosis treated with Denosumab. *J Bone Miner Res* 2012.
57. Gerdhem P, Ivaska KK, Isaksson A, Pettersson K, Vaananen HK, Obrant KJ, Akesson K. Associations between homocysteine, bone turnover, BMD, mortality, and fracture risk in elderly women. *J Bone Miner Res* 2007;22:127-34.
58. German Nutrition Society. New reference values for vitamin D. *Ann Nutr Metab* 2012;60:241-6.
59. Gerstenfeld LC, Thiede M, Seibert K, Mielke C, Phippard D, Svagr B et al. Differential inhibition of fracture healing by non-selective and cyclooxygenase-2 selective non-steroidal anti-inflammatory drugs. *J Orthop Res* 2003;21:670-5.

60. Gjesdal CG, Vollset SE, Ueland PM, Refsum H, Meyer HE, Tell GS. Plasma homocysteine, folate, and vitamin B 12 and the risk of hip fracture: the hordaland homocysteine study. *J Bone Miner Res* 2007;22:747-56.
61. Gomez C, Segura J, Monfort N, Suominen T, Leinonen A, Vahermo M et al. Identification of free and conjugated metabolites of mesocarb in human urine by LC-MS/MS. *Anal Bioanal Chem* 2010;397:2903-16.
62. Gonyeau MJ. Statins and osteoporosis: a clinical review. *Pharmacotherapy* 2005;25:228-43.
63. Green TJ, McMahon JA, Skeaff CM, Williams SM, Whiting SJ. Lowering homocysteine with B vitamins has no effect on biomarkers of bone turnover in older persons: a 2-y randomized controlled trial. *Am J Clin Nutr* 2007;85:460-4.
64. Green TJ, Skeaff CM, McMahon JA, Venn BJ, Williams SM, Devlin AM, Innis SM. Homocysteine-lowering vitamins do not lower plasma S-adenosylhomocysteine in older people with elevated homocysteine concentrations. *Br J Nutr* 2010;103:1629-34.
65. Halleen JM. Tartrate-resistant acid phosphatase 5B is a specific and sensitive marker of bone resorption. *Anticancer Res* 2003;23:1027-9.
66. Halleen JM, Alatalo SL, Suominen H, Cheng S, Janckila AJ, Vaananen HK. Tartrate-resistant acid phosphatase 5b: a novel serum marker of bone resorption. *J Bone Miner Res* 2000;15:1337-45.
67. Halleen JM, Ranta R. Tartrate-resistant acid phosphatase as a serum marker of bone resorption. *Am Clin Lab* 2001;20:29-30.
68. Haussler B, Gothe H, Gol D, Glaeske G, Pientka L, Felsenberg D. Epidemiology, treatment and costs of osteoporosis in Germany--the BoneEVA Study. *Osteoporos Int* 2007;18:77-84.
69. Heaney RP, Recker RR, Watson P, Lappe JM. Phosphate and carbonate salts of calcium support robust bone building in osteoporosis. *Am J Clin Nutr* 2010;92:101-5.
70. Heilbron IM, Kamm ED, Morton RA. The Absorption Spectra of Oils and Oil Constituents with Special Reference to Pro-vitamin D. *Biochem J* 1927;21:1279-83.
71. Herold G.und Mitarbeiter. *Innere Medizin - Eine vorlesungsorientierte Darstellung*. Köln: 2010.
72. Herrmann M, Schmidt J, Umanskaya N, Colaianni G, Al-Marrawi F, Widmann T et al. Stimulation of osteoclast activity by low B-vitamin concentrations. *Bone* 2007;41:584-91.
73. Herrmann M, Kraenzlin M, Pape G, Sand-Hill M, Herrmann W. Relation between homocysteine and biochemical bone turnover markers and bone mineral density in peri- and post-menopausal women. *Clin Chem Lab Med* 2005;43:1118-23.
74. Herrmann M, Peter SJ, Umanskaya N, Wagner A, Taban-Shomal O, Widmann T et al. The role of hyperhomocysteinemia as well as folate, vitamin B(6) and B(12) deficiencies in osteoporosis: a systematic review. *Clin Chem Lab Med* 2007;45:1621-32.

75. Herrmann M, Stanger O, Paulweber B, Hufnagl C, Herrmann W. Folate supplementation does not affect biochemical markers of bone turnover. *Clin Lab* 2006;52:131-6.
76. Herrmann M, Tami A, Wildemann B, Wolny M, Wagner A, Schorr H et al. Hyperhomocysteinemia induces a tissue specific accumulation of homocysteine in bone by collagen binding and adversely affects bone. *Bone* 2009;44:467-75.
77. Herrmann M, Umanskaya N, Wildemann B, Colaianni G, Widmann T, Zallone A, Herrmann M. Stimulation of Osteoblast Activity by Homocysteine. *J Cell Mol Med* 2008;12:1205-10.
78. Herrmann M, Umanskaya N, Traber L, Schmidt-Gayk H, Menke W, Lanzer G et al. The effect of B-vitamins on biochemical bone turnover markers and bone mineral density in osteoporotic patients: a 1-year double blind placebo controlled trial. *Clin Chem Lab Med* 2007;45:1785-92.
79. Herrmann M, Umanskaya N, Wildemann B, Colaianni G, Schmidt J, Widmann T et al. Accumulation of homocysteine by decreasing concentrations of folate, vitamin B12 and B6 does not influence the activity of human osteoblasts in vitro. *Clin Chim Acta* 2007;384:129-34.
80. Herrmann M, Widmann T, Colaianni G, Colucci S, Zallone A, Herrmann W. Increased osteoclast activity in the presence of increased homocysteine concentrations. *Clin Chem* 2005;51:2348-53.
81. Herrmann M, Widmann T, Herrmann W. Homocysteine--a newly recognised risk factor for osteoporosis. *Clin Chem Lab Med* 2005;43:1111-7.
82. Herrmann M, Wildemann B, Claes L, Klohs S, Ohnmacht M, Taban-Shomal O et al. Experimental Hyperhomocysteinemia Reduces Bone Quality in Rats. *Clin Chem* 2007;53:1455-61.
83. Herrmann W. Hyperhomocysteinämie, B-Vitamin-Mangel und Gefäß- sowie neurodegenerative Erkrankungen. In: Thomas L, ed. *Labor und Diagnose - Indikation und Bewertung von Laborbefunden für die medizinische Diagnostik*. Frankfurt/Main: TH-Books Verlagsgesellschaft mbH, 2008:586-621.
84. Herrmann W, Obeid R, Schorr H, Hübner U, Geisel J, Sand-Hill M et al. Enhanced bone metabolism in vegetarians - the role of vitamin B12 deficiency. *Clin Chem Lab Med* 2009;47:1381-7.
85. Herrmann W. The importance of hyperhomocysteinemia as a risk factor for diseases: an overview. *Clin Chem Lab Med* 2001;39:666-74.
86. Herrmann W, Herrmann M, Obeid R. Hyperhomocysteinaemia: a critical review of old and new aspects. *Curr Drug Metab* 2007;8:17-31.
87. Herrmann W, Kirsch SH, Kruse V, Eckert R, Graber S, Geisel J, Obeid R. One year B and D vitamins supplementation improves metabolic bone markers. *Clin Chem Lab Med* 2013;51:639-47.
88. Herrmann W, Obeid R. Causes and early diagnosis of vitamin B12 deficiency. *Dtsch Arztebl Int* 2008;105:680-5.
89. Herrmann W, Obeid R. The mandatory fortification of staple foods with folic acid: a current controversy in Germany. *Dtsch Arztebl Int* 2011;108:249-54.

90. Herrmann W, Obeid R, Schorr H, Geisel J. Functional vitamin B12 deficiency and determination of holotranscobalamin in populations at risk. *Clin Chem Lab Med* 2003;41:1478-88.
91. Herrmann W, Schorr H, Obeid R, Geisel J. Vitamin B-12 status, particularly holotranscobalamin II and methylmalonic acid concentrations, and hyperhomocysteinemia in vegetarians. *Am J Clin Nutr* 2003;78:131-6.
92. Herzlich B, Herbert V. The role of the pancreas in cobalamin (vitamin B12) absorption. *Am J Gastroenterol* 1984;79:489-93.
93. Hickam D, Rugge B, Bianco T, Robinson S, Davis E, Schechtel M, King V. Fracture Prevention Treatments for Postmenopausal Women with Osteoporosis/Clinician's Guide. Agency for Healthcare Research and Quality, 2008.
94. Holstein JH, Herrmann M, Splett C, Herrmann W, Garcia P, Histing T et al. High bone concentrations of homocysteine are associated with altered bone morphology in humans. *Br J Nutr* 2011;106:378-82.
95. Howard L, Kirkwood G, Leese M. Risk of hip fracture in patients with a history of schizophrenia. *Br J Psychiatry* 2007;190:129-34.
96. Hume EM, Lucas NS, Smith HH. On the Absorption of Vitamin D from the Skin. *Biochem J* 1927;21:362-7.
97. Hummer M, Malik P, Gasser RW, Hofer A, Kemmler G, Moncayo Naveda RC et al. Osteoporosis in patients with schizophrenia. *Am J Psychiatry* 2005;162:162-7.
98. Irie S, Hayashida N, Shinkawa T, Taira Y, Sekitani Y, Teraoka S et al. Suitability of tartrate-resistant acid phosphatase type 5b as a screening marker for bone mineral density in community-dwelling elderly individuals. *Tohoku J Exp Med* 2011;224:105-10.
99. Jean G, Vanel T, Terrat JC, Chazot C. Prevention of secondary hyperparathyroidism in hemodialysis patients: the key role of native vitamin D supplementation. *Hemodial Int* 2010;14:486-91.
100. Jeon YK, Lee JG, Kim SS, Kim BH, Kim SJ, Kim YK, Kim IJ. Association between bone mineral density and metabolic syndrome in pre- and postmenopausal women. *Endocr J* 2011.
101. Johnell O, Kanis JA. An estimate of the worldwide prevalence and disability associated with osteoporotic fractures. *Osteoporos Int* 2006;17:1726-33.
102. Johnell O, Oden A, De Laet C, Garnero P, Delmas PD, Kanis JA. Biochemical indices of bone turnover and the assessment of fracture probability. *Osteoporos Int* 2002;13:523-6.
103. Johnston CC, Jr. Development of clinical practice guidelines for prevention and treatment of osteoporosis. *Calcif Tissue Int* 1996;59 Suppl 1:S30-S33.
104. Judd SE, Nanes MS, Ziegler TR, Wilson PW, Tangpricha V. Optimal vitamin D status attenuates the age-associated increase in systolic blood pressure in white Americans: results from the third National Health and Nutrition Examination Survey. *Am J Clin Nutr* 2008;87:136-41.

105. Judd SE, Tangpricha V. Vitamin D deficiency and risk for cardiovascular disease. *Am J Med Sci* 2009;338:40-4.
106. Kasperk CH, Wakley GK, Hierl T, Ziegler R. Gonadal and adrenal androgens are potent regulators of human bone cell metabolism in vitro. *J Bone Miner Res* 1997;12:464-71.
107. Kassem M, Eriksen EF, Melsen F, Mosekilde L. Antacid-induced osteomalacia: a case report with a histomorphometric analysis. *J Intern Med* 1991;229:275-9.
108. Kato K, Adachi S, Matsushima-Nishiwaki R, Minamitani C, Natsume H, Katagiri Y et al. Regulation by heat shock protein 27 of osteocalcin synthesis in osteoblasts. *Endocrinology* 2011;152:1872-82.
109. Kendler DL, Bessette L, Hill CD, Gold DT, Horne R, Varon SF et al. Preference and satisfaction with a 6-month subcutaneous injection versus a weekly tablet for treatment of low bone mass. *Osteoporos Int* 2010;21:837-46.
110. Kerins DM, Koury MJ, Capdevila A, Rana S, Wagner C. Plasma S-adenosylhomocysteine is a more sensitive indicator of cardiovascular disease than plasma homocysteine. *Am J Clin Nutr* 2001;74:723-9.
111. Keser I, Ilich JZ, Vrkic N, Giljevic Z, Colic B, I. Folic acid and vitamin B(12) supplementation lowers plasma homocysteine but has no effect on serum bone turnover markers in elderly women: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Nutr Res* 2013;33:211-9.
112. Kesson CM, Morris N, McCutcheon A. Generalized Osteoporosis in Old Age. *Ann Rheum Dis* 1947;6:146-61.
113. Khandwala HM, Mumm S, Whyte MP. Low serum alkaline phosphatase activity and pathologic fracture: case report and brief review of hypophosphatasia diagnosed in adulthood. *Endocr Pract* 2006;12:676-81.
114. Kim DH, Sabour S, Sagar UN, Adams S, Whellan DJ. Prevalence of hypovitaminosis D in cardiovascular diseases (from the National Health and Nutrition Examination Survey 2001 to 2004). *Am J Cardiol* 2008;102:1540-4.
115. Kinjo M, Setoguchi S, Solomon DH. Bone mineral density in older adult patients with rheumatoid arthritis: an analysis of NHANES III. *J Rheumatol* 2007;34:1971-5.
116. Kirsch SH, Knapp JP, Geisel J, Herrmann W, Obeid R. Simultaneous quantification of S-adenosyl methionine and S-adenosyl homocysteine in human plasma by stable-isotope dilution ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2009;877:3865-70.
117. Kirsch SH, Knapp JP, Herrmann W, Obeid R. Quantification of key folate forms in serum using stable-isotope dilution ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2010;878:68-75.
118. Kleinberg DL, Davis JM, de CR, Van BB, Brecher M. Prolactin levels and adverse events in patients treated with risperidone. *J Clin Psychopharmacol* 1999;19:57-61.

119. Knapen MH, Eisenwiener HG, Vermeer C. Osteocalcin detection in aging serum and whole blood: stability of different osteocalcin fractions. *Clin Chim Acta* 1996;256:151-64.
120. Konnopka A, Jerusel N, Konig HH. The health and economic consequences of osteopenia- and osteoporosis-attributable hip fractures in Germany: estimation for 2002 and projection until 2050. *Osteoporos Int* 2009;20:1117-29.
121. Korpela J, Tiitinen SL, Hiekkänen H, Halleen JM, Selander KS, Vaananen HK et al. Serum TRACP 5b and ICTP as markers of bone metastases in breast cancer. *Anticancer Res* 2006;26:3127-32.
122. Kozyraki R, Kristiansen M, Silahatoglu A, Hansen C, Jacobsen C, Tommerup N et al. The human intrinsic factor-vitamin B12 receptor, cubilin: molecular characterization and chromosomal mapping of the gene to 10p within the autosomal recessive megaloblastic anemia (MGA1) region. *Blood* 1998;91:3593-600.
123. Krebs HA, Hems R, Tyler B. The regulation of folate and methionine metabolism. *Biochem J* 1976;158:341-53.
124. Kutzbach C, Stokstad EL. Mammalian methylenetetrahydrofolate reductase. Partial purification, properties, and inhibition by S-adenosylmethionine. *Biochim Biophys Acta* 1971;250:459-77.
125. Lamp EC, Drexler HG. Biology of tartrate-resistant acid phosphatase. *Leuk Lymphoma* 2000;39:477-84.
126. Lau KH, Onishi T, Wergedal JE, Singer FR, Baylink DJ. Characterization and assay of tartrate-resistant acid phosphatase activity in serum: potential use to assess bone resorption. *Clin Chem* 1987;33:458-62.
127. Leidig-Bruckner G, Roth HJ, Bruckner T, Lorenz A, Raue F, Frank-Raue K. Are commonly recommended dosages for vitamin D supplementation too low? Vitamin D status and effects of supplementation on serum 25-hydroxyvitamin D levels--an observational study during clinical practice conditions. *Osteoporos Int* 2011;22:231-40.
128. Leklem JE. Vitamin B6. In: Rucker RB, Suttie JW, McCormick DB, Machlin LJ, eds. *Handbook of Vitamins*. New York: Marcel Dekker Inc, 2001:339-96.
129. Lewiecki EM. Update on bone density testing. *Curr Osteoporos Rep* 2005;3:136-42.
130. Li X, Song QS, Wang JY, Leng HJ, Chen ZQ, Liu ZJ et al. Simvastatin induces estrogen receptor-alpha expression in bone, restores bone loss, and decreases ERalpha expression and uterine wet weight in ovariectomized rats. *J Bone Miner Metab* 2010.
131. Lin WY, Wan L, Tsai CH, Chen RH, Lee CC, Tsai FJ. Vitamin D receptor gene polymorphisms are associated with risk of Hashimoto's thyroiditis in Chinese patients in Taiwan. *J Clin Lab Anal* 2006;20:109-12.
132. Lippuner K, Golder M, Greiner R. Epidemiology and direct medical costs of osteoporotic fractures in men and women in Switzerland. *Osteoporos Int* 2005;16 Suppl 2:S8-S17.



133. Lips P. Vitamin D deficiency and secondary hyperparathyroidism in the elderly: consequences for bone loss and fractures and therapeutic implications. *Endocr Rev* 2001;22:477-501.
134. Lock CA, Lecouturier J, Mason JM, Dickinson HO. Lifestyle interventions to prevent osteoporotic fractures: a systematic review. *Osteoporos Int* 2006;17:20-8.
135. MacKenzie DA, Janes JM. Postmenopausal osteoporosis: a programme of treatment in 42 cases. *Can Med Assoc J* 1954;71:339-40.
136. Malviya A, Kuiper JH, Makwana N, Laing P, Ashton B. The effect of newer anti-rheumatic drugs on osteogenic cell proliferation: an in-vitro study. *J Orthop Surg Res* 2009;4:17.
137. Manson JE, Allison MA, Carr JJ, Langer RD, Cochrane BB, Hendrix SL et al. Calcium/vitamin D supplementation and coronary artery calcification in the Women's Health Initiative. *Menopause* 2010;17:683-91.
138. Mazzantini M, di MO, Sinigaglia L, Bianchi G, Rossini M, Mela Q et al. Effect of cyclosporine A on bone density in female rheumatoid arthritis patients: results from a multicenter, cross-sectional study. *Clin Exp Rheumatol* 2007;25:709-15.
139. McClung MR. Bisphosphonates. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2003;32:253-71.
140. McClung MR, Lewiecki EM, Cohen SB, Bolognese MA, Woodson GC, Moffett AH et al. Denosumab in postmenopausal women with low bone mineral density. *N Engl J Med* 2006;354:821-31.
141. McKane WR, Khosla S, Egan KS, Robins SP, Burritt MF, Riggs BL. Role of calcium intake in modulating age-related increases in parathyroid function and bone resorption. *J Clin Endocrinol Metab* 1996;81:1699-703.
142. McKusick VA. Heritable disorders of connective tissue. St. Louis: C.V. Mosby, 1966:155pp.
143. McLean RR, Jacques PF, Selhub J, Tucker KL, Samelson EJ, Broe KE et al. Homocysteine as a predictive factor for hip fracture in older persons. *N Engl J Med* 2004;350:2042-9.
144. Medina M, Urdiales JL, mores-Sanchez MI. Roles of homocysteine in cell metabolism: old and new functions. *Eur J Biochem* 2001;268:3871-82.
145. Meema HE, Meema S. Prevention of postmenopausal osteoporosis by hormone treatment of the menopause. *Can Med Assoc J* 1968;99:248-51.
146. Meier CR, Schlienger RG, Kraenzlin ME, Schlegel B, Jick H. HMG-CoA reductase inhibitors and the risk of fractures. *JAMA* 2000;283:3205-10.
147. Melton LJ, III. Adverse outcomes of osteoporotic fractures in the general population. *J Bone Miner Res* 2003;18:1139-41.
148. Miner SE, Evrovski J, Cole DE. Clinical chemistry and molecular biology of homocysteine metabolism: an update. *Clin Biochem* 1997;30:189-201.
149. Mirza FS, Padhi ID, Raisz LG, Lorenzo JA. Serum sclerostin levels negatively correlate with parathyroid hormone levels and free estrogen index in postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab* 2010;95:1991-7.

150. Misra M, Papakostas GI, Klibanski A. Effects of psychiatric disorders and psychotropic medications on prolactin and bone metabolism. *J Clin Psychiatry* 2004;65:1607-18.
151. Mitra R. Adverse effects of corticosteroids on bone metabolism: a review. *PM R* 2011;3:466-71.
152. Moester MJ, Papapoulos SE, Lowik CW, van Bezooijen RL. Sclerostin: current knowledge and future perspectives. *Calcif Tissue Int* 2010;87:99-107.
153. Mueller D, Weyler E, Gandjour A. Cost effectiveness of the German screen-and-treat strategy for postmenopausal osteoporosis. *Pharmacoeconomics* 2008;26:513-36.
154. Need AG. Bone resorption markers in vitamin D insufficiency. *Clin Chim Acta* 2006;368:48-52.
155. Neer RM, Arnaud CD, Zanchetta JR, Prince R, Gaich GA, Reginster JY et al. Effect of parathyroid hormone (1-34) on fractures and bone mineral density in postmenopausal women with osteoporosis. *N Engl J Med* 2001;344:1434-41.
156. Ngamruengphong S, Leontiadis GI, Radhi S, Dentino A, Nugent K. Proton Pump Inhibitors and Risk of Fracture: A Systematic Review and Meta-Analysis of Observational Studies. *Am J Gastroenterol* 2011.
157. Nurmi-Luthje I, Sund R, Juntunen M, Luthje P. Post-hip fracture use of prescribed calcium plus vitamin D or vitamin D supplements and anti-osteoporotic drugs are associated with lower mortality. A nationwide study in Finland. *J Bone Miner Res* 2011.
158. O'Keane V, Meaney AM. Antipsychotic drugs: a new risk factor for osteoporosis in young women with schizophrenia? *J Clin Psychopharmacol* 2005;25:26-31.
159. Ominsky MS, Li C, Li X, Tan HL, Lee E, Barrero M et al. Inhibition of sclerostin by monoclonal antibody enhances bone healing and improves bone density and strength of non-fractured bones. *J Bone Miner Res* 2010.
160. Ominsky MS, Stouch B, Schroeder J, Pyrah I, Stolina M, Smith SY, Kostenuik PJ. Denosumab, a fully human RANKL antibody, reduced bone turnover markers and increased trabecular and cortical bone mass, density, and strength in ovariectomized cynomolgus monkeys. *Bone* 2011.
161. Ooms ME, Roos JC, Bezemer PD, van der Vijgh, Bouter LM, Lips P. Prevention of bone loss by vitamin D supplementation in elderly women: a randomized double-blind trial. *J Clin Endocrinol Metab* 1995;80:1052-8.
162. Ozdem S, Samanci S, Tasatargil A, Yildiz A, Sadan G, Donmez L, Herrmann M. Experimental hyperhomocysteinemia disturbs bone metabolism in rats. *Scand J Clin Lab Invest* 2007;67:748-56.
163. Pack AM. Treatment of Epilepsy to Optimize Bone Health. *Curr Treat Options Neurol* 2011.
164. Park SY, Murphy SP, Wilkens LR, Nomura AM, Henderson BE, Kolonel LN. Calcium and vitamin D intake and risk of colorectal cancer: the Multiethnic Cohort Study. *Am J Epidemiol* 2007;165:784-93.

165. Perez-Castrillon JL, Pinacho F, De LD, Lopez-Menendez M, Duenas LA. Odanacatib, a new drug for the treatment of osteoporosis: review of the results in postmenopausal women. *J Osteoporos* 2010;2010.
166. Peterlik M, Grant WB, Cross HS. Calcium, vitamin D and cancer. *Anticancer Res* 2009;29:3687-98.
167. Piemonte S, Romagnoli E, Bratengeier C, Woloszczuk W, Tancredi A, Pepe J et al. Serum sclerostin levels decline in postmenopausal women with osteoporosis following treatment with intermittent PTH. *J Endocrinol Invest* 2012.
168. Pilz S, Tomaschitz A, Friedl C, Amrein K, Drechsler C, Ritz E et al. Vitamin D status and mortality in chronic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant* 2011.
169. Pizzolo F, Blom HJ, Choi SW, Girelli D, Guarini P, Martinelli N et al. Folic acid effects on s-adenosylmethionine, s-adenosylhomocysteine, and DNA methylation in patients with intermediate hyperhomocysteinemia. *J Am Coll Nutr* 2011;30:11-8.
170. Prestwood KM, Pannullo AM, Kenny AM, Pilbeam CC, Raisz LG. The effect of a short course of calcium and vitamin D on bone turnover in older women. *Osteoporos Int* 1996;6:314-9.
171. Price CP. Multiple forms of human serum alkaline phosphatase: detection and quantitation. *Ann Clin Biochem* 1993;30 ( Pt 4):355-72.
172. Prince RL, Smith M, Dick IM, Price RI, Webb PG, Henderson NK, Harris MM. Prevention of postmenopausal osteoporosis. A comparative study of exercise, calcium supplementation, and hormone-replacement therapy. *N Engl J Med* 1991;325:1189-95.
173. Quesada Gomez JM, Blanch RJ, Diaz CM, Diez PA. Calcium citrate and vitamin D in the treatment of osteoporosis. *Clin Drug Investig* 2011;31:285-98.
174. Reichel H, Esser A, Roth HJ, Schmidt-Gayk H. Influence of PTH assay methodology on differential diagnosis of renal bone disease. *Nephrol Dial Transplant* 2003;18:759-68.
175. Riggs BL. Overview of osteoporosis. *West J Med* 1991;154:63-77.
176. Rodino MA, Shane E. Osteoporosis after organ transplantation. *Am J Med* 1998;104:459-69.
177. Rosenheim O, Webster TA. The Relation of Cholesterol to Vitamin D. *Biochem J* 1927;21:127-9.
178. Ross AC, Manson JE, Abrams SA, Aloia JF, Brannon PM, Clinton SK et al. The 2011 Dietary Reference Intakes for Calcium and Vitamin D: what dietetics practitioners need to know. *J Am Diet Assoc* 2011;111:524-7.
179. Saag KG, Shane E, Boonen S, Marin F, Donley DW, Taylor KA et al. Teriparatide or alendronate in glucocorticoid-induced osteoporosis. *N Engl J Med* 2007;357:2028-39.
180. Said HM, Mohammed ZM. Intestinal absorption of water-soluble vitamins: an update. *Curr Opin Gastroenterol* 2006;22:140-6.

181. Said ZM, Subramanian VS, Vaziri ND, Said HM. Pyridoxine uptake by colonocytes: a specific and regulated carrier-mediated process. *Am J Physiol Cell Physiol* 2008;294:C1192-C1197.
182. Saito M, Fujii K, Marumo K. Degree of Mineralization-related Collagen Crosslinking in the Femoral Neck Cancellous Bone in Cases of Hip Fracture and Controls. *Calcif Tissue Int* 2006;79:160-8.
183. Sakamoto W, Isomura H, Fujie K, Deyama Y, Kato A, Nishihira J, Izumi H. Homocysteine attenuates the expression of osteocalcin but enhances osteopontin in MC3T3-E1 preosteoblastic cells. *Biochim Biophys Acta* 2005;1740:12-6.
184. Sakamoto W, Isomura H, Fujie K, Deyama Y, Kato A, Nishihira J, Izumi H. Homocysteine attenuates the expression of osteocalcin but enhances osteopontin in MC3T3-E1 preosteoblastic cells. *Biochim Biophys Acta* 2005;1740:12-6.
185. Sato Y, Honda Y, Iwamoto J, Kanoko T, Satoh K. Effect of folate and mecobalamin on hip fractures in patients with stroke: a randomized controlled trial. *JAMA* 2005;293:1082-8.
186. Segre GV, Niall HD, Habener JF, Potts JT, Jr. Metabolism of parathyroid hormone: physiologic and clinical significance. *Am J Med* 1974;56:774-84.
187. Seibel MJ, Woitge H, Scheidt-Nave C, Leidig-Bruckner G, Duncan A, Nicol P et al. Urinary hydroxypyridinium crosslinks of collagen in population-based screening for overt vertebral osteoporosis: results of a pilot study. *J Bone Miner Res* 1994;9:1433-40.
188. Selhub J, Miller JW. The pathogenesis of homocysteinemia: interruption of the coordinate regulation by S-adenosylmethionine of the remethylation and transsulfuration of homocysteine. *Am J Clin Nutr* 1992;55:131-8.
189. Selhub J, Miller JW. The pathogenesis of homocysteinemia: interruption of the coordinate regulation by S-adenosylmethionine of the remethylation and transsulfuration of homocysteine  
2. *Am J Clin Nutr* 1992;55:131-8.
190. Shane E, Rivas M, McMahon DJ, Staron RB, Silverberg SJ, Seibel MJ et al. Bone loss and turnover after cardiac transplantation. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82:1497-506.
191. Shum KT, Chan C, Leung CM, Tanner JA. Identification of a DNA aptamer that inhibits sclerostin's antagonistic effect on Wnt signalling. *Biochem J* 2011;434:493-501.
192. Silverman SL. Sclerostin. *J Osteoporos* 2010;2010:941419.
193. Simon AM, Manigrasso MB, O'Connor JP. Cyclo-oxygenase 2 function is essential for bone fracture healing. *J Bone Miner Res* 2002;17:963-76.
194. Smith RW, Jr., Frame B. Concurrent axial and appendicular osteoporosis: Its relation to calcium consumption. *N Engl J Med* 1965;273:73-8.
195. Spolidorio LC, Herrera BS, Coimbra LS, Spolidorio DM, Muscara MN, Rossa C, Jr. Intermittent therapy with 1,25 vitamin D and calcitonin prevents cyclosporin-induced alveolar bone loss in rats. *Calcif Tissue Int* 2010;87:236-45.

196. Stabler SP, Marcell PD, Podell ER, Allen RH. Quantitation of total homocysteine, total cysteine, and methionine in normal serum and urine using capillary gas chromatography-mass spectrometry. *Anal Biochem* 1987;162:185-96.
197. Szodoray P, Nakken B, Gaal J, Jonsson R, Szegedi A, Zold E et al. The complex role of vitamin D in autoimmune diseases. *Scand J Immunol* 2008;68:261-9.
198. Targownik LE, Leslie WD. The relationship among proton pump inhibitors, bone disease and fracture. *Expert Opin Drug Saf* 2011.
199. The North American Menopause Society. Management of osteoporosis in postmenopausal women: 2010 position statement of The North American Menopause Society, 17 ed. 2010:25-54pp.
200. Tighe P, Ward M, McNulty H, Finnegan O, Dunne A, Strain J et al. A dose-finding trial of the effect of long-term folic acid intervention: implications for food fortification policy. *Am J Clin Nutr* 2011;93:11-8.
201. Trancik T, Mills W, Vinson N. The effect of indomethacin, aspirin, and ibuprofen on bone ingrowth into a porous-coated implant. *Clin Orthop Relat Res* 1989;113-21.
202. Trump DL, Deeb KK, Johnson CS. Vitamin D: considerations in the continued development as an agent for cancer prevention and therapy. *Cancer J* 2010;16:1-9.
203. Tsur A, Metzger M, Dresner-Pollak R. Effect of different dress style on vitamin D level in healthy young Orthodox and ultra-Orthodox students in Israel. *Osteoporos Int* 2010.
204. Uebelhart D, Gineyts E, Chapuy MC, Delmas PD. Urinary excretion of pyridinium crosslinks: a new marker of bone resorption in metabolic bone disease. *Bone Miner* 1990;8:87-96.
205. Utvag SE, Fuskevåg OM, Shegarfi H, Reikeras O. Short-term treatment with COX-2 inhibitors does not impair fracture healing. *J Invest Surg* 2010;23:257-61.
206. Valero C, Zarrabeitia MT, Hernandez JL, Pineda B, Cano A, Garcia-Perez MA, Riancho JA. Relationship of sclerostin and secreted frizzled protein polymorphisms with bone mineral density: an association study with replication in postmenopausal women. *Menopause* 2011.
207. van Meurs JB, Dhonukshe-Rutten RA, Pluijm SM, van der Klift M, de Jonge R, Lindemans J et al. Homocysteine levels and the risk of osteoporotic fracture. *N Engl J Med* 2004;350:2033-41.
208. Vestergaard P. Skeletal effects of drugs to treat cancer. *Curr Drug Saf* 2008;3:173-7.
209. Wallach S, Henneman PH. Prolonged estrogen therapy in postmenopausal women. *J Am Med Assoc* 1959;171:1637-42.
210. Williams LJ, Pasco JA, Henry MJ, Sanders KM, Nicholson GC, Kotowicz MA, Berk M. Paracetamol (acetaminophen) use, fracture and bone mineral density. *Bone* 2011.

211. Xia X, Kar R, Gluhak-Heinrich J, Yao W, Lane NE, Bonewald LF et al. Glucocorticoid-induced autophagy in osteocytes. *J Bone Miner Res* 2010;25:2479-88.
212. Xian CJ, Cool JC, Scherer MA, Macsai CE, Fan C, Covino M, Foster BK. Cellular mechanisms for methotrexate chemotherapy-induced bone growth defects. *Bone* 2007;41:842-50.
213. Ylipahkala H, Halleen JM, Kaija H, Vihko P, Vaananen HK. Tartrate-resistant acid phosphatase 5B circulates in human serum in complex with alpha2-macroglobulin and calcium. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;308:320-4.
214. Yoshida M, Kanno Y, Ishisaki A, Tokuda H, Hirade K, Nakajima K et al. Methotrexate suppresses inflammatory agonist induced interleukin 6 synthesis in osteoblasts. *J Rheumatol* 2005;32:787-95.
215. Yoshimura N, Muraki S, Oka H, Kawaguchi H, Nakamura K, Akune T. Biochemical markers of bone turnover as predictors of osteoporosis and osteoporotic fractures in men and women: 10-year follow-up of the Taiji cohort. *Mod Rheumatol* 2011.
216. Yue J, Zhang X, Dong B, Yang M. Statins and bone health in postmenopausal women: a systematic review of randomized controlled trials. *Menopause* 2010;17:1071-9.
217. Zhou Y, Li Y, Zhang D, Wang J, Yang H. Prevalence and predictors of osteopenia and osteoporosis in postmenopausal Chinese women with type 2 diabetes. *Diabetes Res Clin Pract* 2010;90:261-9.

## 6. Anhang:

### 6.1 Informationen für den Hausarzt

Sehr geehrte Frau Kollegin, sehr geehrter Herr Kollege,

Ihre Patientin bzw. Ihr Patient \_\_\_\_\_ nimmt an einer von der Ethikkommission genehmigten prospektiven, randomisierten, doppelblinden und placebokontrollierten Studie teil. Diese wird von der Universitätsklinik Homburg in Zusammenarbeit mit der Geriatrischen Rehaklinik St. Ingbert durchgeführt.

#### Ziel:

Es ist das Ziel, die in vitro beobachteten positiven Effekte von Vitamin B auf den Knochenstoffwechsel auch prospektiv in vivo bei älteren Menschen nachzuweisen. Dies könnte Auswirkungen auf die Ernährungsempfehlungen einer großen Bevölkerungsschicht haben.

#### Ablauf:

Jeder Patient erhält als Basistherapie Vitamin D und Calcium. Zusätzlich erhalten die Patienten entweder Vitamin B<sub>6</sub>, Folsäure (=B<sub>9</sub>) und Vitamin B<sub>12</sub> oder Placebo. Die Verum- und Placebokapseln unterscheiden sich äußerlich nicht. Die Vitamin B – Dosen entsprechen denen, die zur Vorbeugung und Behandlung von Vitaminmangelerscheinungen empfohlen sind. Jeder Patient nimmt ein Jahr lang täglich morgens eine grüne, mittags eine weiße und abends eine braune Kapsel ein. Den Medikamentenvorrat erhalten die Patienten von uns. Zu Beginn der Untersuchung und am Ende wird von uns Blut und Urin abgenommen, um darin verschiedene Marker des Vitamin- und Knochenstoffwechsels zu messen. Wir werden in regelmäßigen Abständen telefonisch mit den Patienten oder den Angehörigen in Kontakt bleiben.

#### Abbruchkriterien:

Selbstverständlich hat jede medizinisch erforderliche Behandlung Vorrang vor der Studie. Deshalb ergeben sich folgende Abbruchkriterien:

Medikamente: Corticosteroide, Methotrexat, spezifische osteologische Therapie, zusätzliche Therapie mit Vitamin B<sub>12</sub>, Folsäure, Vitamin B<sub>6</sub>, Vitamin D oder Calcium.

Akute Erkrankungen: Herzinfarkt, Krebserkrankung, Apoplex oder ein operativer Eingriff führen ebenfalls zum Studienabbruch.

#### Ihre Aufgabe:

**Außer den Abbruchkriterien brauchen Sie nichts zu beachten. Sollten diese eintreten, bitten wir um eine kurze Benachrichtigung.**

Wenn Sie weitere Fragen haben oder Informationen wünschen, können Sie sich gerne mit uns in Verbindung setzen:

Frau Prof. Dr. Obeid: Tel. 06841 - 1630711, CA Dr. Eckert: s.o.

Vielen Dank! Mit freundlichen kollegialen Grüßen

Dr. Eckert



Das Kreiskrankenhaus  
St. Ingbert

Gesundheitspark 1

66386 St. Ingbert

Telefon: 0 68 94 – 108 451

Telefax: 0 68 94 – 108 452

E-mail: geriatric@  
kkh-geriatric-igb.de

Internet: www.kkh-geriatric-igb.de

### GERIATRISCHE REHAKLINIK

Zertifiziert nach DIN EN ISO 9001

Gem. Kr. nach § 4 Abs. 5 MB/KK

**CA Dr. Rudolf Eckert**

Ihr Ansprechpartner/-in:

Frau Ley

Unsere Zeichen: Eck /

Telefon: 0 68 94 / 108 - 451

Datum: August 2009

Wir behandeln ältere multimorbide Patienten, deren Selbstständigkeit eingeschränkt ist:

#### fachärztlich:

- Innere Medizin
- Physikalische und Rehabilitative Medizin
- Allgemeinmedizin
- konsiliarisch u. a. Chirurgie
- Unfallchirurgie
- Kardiologie
- Neurologie

#### rehabilitativ:

- Ergotherapie
- Logopädie
- Pflegedienst
- Physiotherapie
- Physikalische Therapie
- Psychologie
- Sozialdienst

Geschäftsführer:

Wolfgang Steil

Dipl.-Kfm. Frank F. Banowitz

Aufsichtsratsvorsitzender:

Clemens Lindemann

Amtsgericht Saarbrücken:

HRB 32799 88

## **6.2 Patienteninformation und Einwilligungserklärung**

### **Auswirkungen der Nahrungsergänzung mit Vitamin B<sub>6</sub>, Folsäure (= Vitamin B<sub>9</sub>) und Vitamin B<sub>12</sub> auf den Knochenstoffwechsel zusätzlich zur Therapie mit Vitamin D und Kalzium**

**Sehr geehrte Patientin, sehr geehrter Patient,**

wir möchten Sie bitten, an einer Studie der Universitätsklinik Homburg in Zusammenarbeit mit der Geriatrischen Rehaklinik St. Ingbert teilzunehmen, mit der die Auswirkungen von Vitaminpräparaten auf den Knochenstoffwechsel untersucht werden.

#### **Gründe, Ablauf und Ziel der Untersuchung**

Mit zunehmendem Alter wird der Knochen immer stärker entkalkt. Dies führt schließlich zu OSP. Wir wollen untersuchen, ob die Vitamine B<sub>6</sub>, Folsäure (= Vitamin B<sub>9</sub>) und Vitamin B<sub>12</sub>, die zusätzlich zu der üblichen Therapie mit Vitamin D und Kalzium eingenommen werden, eine positive Wirkung auf den Knochenaufbau haben.

Der Knochenstoffwechsel reagiert sehr langsam. Deshalb dauert die Therapie ein Jahr. Sie nehmen in dieser Zeit täglich morgens eine grüne, mittags eine weiße und abends eine braune Kapsel ein, die Vitamin D und Kalzium (mit schon nachgewiesener guter Wirkung auf den Knochen) und ggf. zusätzlich die oben genannten B-Vitamine ein. Zu Beginn der Untersuchung und nach einem Jahr wird der Urin untersucht und es wird Ihnen Blut abgenommen, um darin die Konzentrationen der Vitamine und die der Marker des Knochenstoffwechsels zu messen.

Die Einnahme der niedrig dosierten Vitaminpräparate ist unbedenklich, da die Dosen offiziell zur Behandlung und Vorbeugung von Vitaminmangelerscheinungen empfohlen sind und zuvor Gegenindikationen ausgeschlossen wurden. Sie werden alle 3 Monate telefonisch nach Ihrem Befinden gefragt und erhalten in diesem Intervall von uns kostenlos die nächsten Kapseln. Die Blutentnahme aus einer Armvene erfolgt mit den im Krankenhaus üblichen Nadeln. Die damit verbundenen Risiken wie z. B. Bluterguss oder Verletzung anderer Gewebe sind minimal.

Durch die Studie haben Sie praktisch keine zusätzlichen Belastungen. Sie sollten lediglich darauf achten, dass Sie keine anderen Vitamine der B – Gruppe und nicht zusätzlich Vitamin D und Kalzium einnehmen. Wenn die Einnahme von bestimmten Medikamenten, die den Knochenaufbau oder den Knochenabbau beeinflussen, während des Studienzeitraumes notwendig wird, ist die weitere Teilnahme an dieser Untersuchung nicht möglich. Ihr Hausarzt ist darüber informiert.



Diese Studie kann einen Beitrag zum effektiven und nebenwirkungsarmen Vorbeugen oder zur Therapie mit Vitaminen liefern, um der Knochenentkalkung entgegenzuwirken. Ihre Teilnahme hat damit Bedeutung für die Weiterentwicklung der medizinischen Therapie. Zusätzlich sparen Sie die Kosten der ohnehin sinnvollen Vitaminergänzung.

### **Einwilligungserklärung**

Die Studienteilnahme ist freiwillig. Sie können jederzeit Ihre Einwilligung widerrufen und die in der Studie verwendete Blutprobe von der Untersuchung zurückziehen. Versicherungsschutz besteht im Rahmen einer allgemeinen Patientenversicherung der Geriatrischen Rehaklinik St. Ingbert.

### **Datenschutz**

1) Ich erkläre mich damit einverstanden, dass die im Rahmen dieser klinischen Prüfung erhobene Daten, insbesondere Angaben über meine Gesundheit, in Papierform und auf elektronischen Datenträgern in der geriatrischen Rehaklinik St. Ingbert aufgezeichnet werden. Soweit erforderlich, dürfen die erhobenen Daten pseudoanonymisiert (verschlüsselt) weitergegeben werden.

2) Außerdem erkläre ich mich damit einverstanden, dass autorisierte und zur Verschwiegenheit verpflichtete Beauftragte die zuständigen inländischen und ausländischen Überwachungsbehörden in meine beim Prüfarzt vorhandenen personenbezogenen Daten, insbesondere meine Gesundheitsdaten, Einsicht nehmen, soweit dies für die Überprüfung der ordnungsgemäßen Durchführung der Studie notwendig ist. Für diese Maßnahme entbinde ich den Prüfarzt von der ärztlichen Schweigepflicht.

3) Die Einwilligung zur Erhebung und Verarbeitung meiner personenbezogenen Daten, insbesondere der Angaben über meine Gesundheit, ist unwiderruflich. Ich bin bereits darüber aufgeklärt worden, dass ich jederzeit die Teilnahme an der klinischen Prüfung beenden kann. Im Fall eines solchen Widerrufs meiner Einwilligung, an der Studie teilzunehmen, erkläre ich mich damit einverstanden, dass die bis zu diesem Zeitpunkt gespeicherten Daten ohne Namensnennung weiterhin verwendet werden dürfen, soweit dies erforderlich ist.

4) Ich erkläre mich damit einverstanden, dass meine Daten nach Beendigung oder Abbruch der Prüfung mindestens zehn Jahre aufbewahrt werden, wie es die Vorschriften über die klinische Prüfung von Arzneimitteln bestimmen. Danach werden meine personenbezogenen Daten gelöscht, soweit nicht gesetzliche, satzungsmäßige oder vertragliche Aufbewahrungsfristen entgegenstehen.

## **Einwilligungserklärung zu Studienteilnahme und Datenschutz**

**Mit Ihrer Unterschrift erklären Sie, dass Sie diese Probandeninformation gelesen und verstanden haben und freiwillig zur Teilnahme an der Untersuchung bereit sind.**

**Ferner stimmen Sie mit Ihrer Unterschrift der Weitergabe der während der Studie erhobenen Daten in anonymisierter Form an autorisierte Dritte zu.**

**Sie haben das Recht, jederzeit die Teilnahme an der Untersuchung ohne Nennung von Gründen zu widerrufen.**

---

**Ort, Datum**

---

**Name Patient**

---

**Unterschrift Patient**

---

**aufklärender Arzt**

### 6.3 Randomisierungsbogen

#### 1 Im Zentrallabor UKS zu erledigen:

Sr.:           Aktuelles Datum: ..20

Sr.:           Interne Patienten-Nr.:

Sr.:           Initialen Patient: Vorname, Name:

Sr.:           Geschlecht: ☐ männlich           ☐ weiblich

Sr.:           Geburtsdatum: ..19

CA:           Handzeichen Zentrallabor (Obeid): \_\_\_\_\_

Sek:           Fax an Biometrie:  
(Bei Rückfragen: Tel. 06841 – 16 22060)

06841 – 16 22062

#### 2 In der Biometrie zu erledigen:

Zuordnung Therapiegruppe:

☐ A

☐ B

Patienten-Nr. in der Studie:

Handzeichen Biometrie:

\_\_\_\_\_

Fax an Zentrallabor:  
(Bei Rückfragen: Tel. 06841 – 16 30711)

06841 – 16 30703

#### 3 Therapiebeginn:

CA:           Info an Station und Therapiebeginn:

..20

CA:           Handzeichen Zentrallabor (Obeid): \_\_\_\_\_

## 6.4 Telefoncheckliste

Datum: \_\_\_\_\_

**Guten Tag Frau/Herr \_\_\_\_\_!**

Mein Name ist \_\_\_\_\_ von der Universitätsklinik Homburg.  
Sie / Ihre Angehörige nehmen an einer Untersuchung über den Einfluss verschiedener Vitamine auf den Knochenstoffwechsel teil. Die Untersuchung wurde in der geriatrischen Rehaklinik St. Ingbert begonnen. Jetzt bin ich für Sie zuständig. Haben Sie einen Moment Zeit zur Beantwortung einiger Fragen? (Wenn nein: Wann kann ich Sie wieder anrufen (Tag, Uhrzeit)?

1. Wie geht es Ihnen? ☐ s. R. \_\_\_\_\_
2. Haben Sie außergewöhnliche gesundheitliche Beschwerden? ☐ s.R. \_\_\_\_\_
3. Wurden Sie in letzter Zeit operiert? ☐ s. R. \_\_\_\_\_
4. Waren Sie in letzter Zeit im Krankenhaus? ☐ s. R. \_\_\_\_\_
5. Nehmen Sie noch regelmäßig die Vitamintabletten ein? ☐ s. R. \_\_\_\_\_
6. Wann nehmen Sie die Tabletten ein? ☐ s. R. \_\_\_\_\_
7. Wie viele Vitamintabletten haben Sie noch? ☐ s. R. \_\_\_\_\_
8. Wir würden Ihnen gerne den Bedarf für die nächsten 3 Monate per Post schicken! ☐ .
9. Haben Sie vom Arzt neue Medikamente oder Vitamine bekommen? ☐ s. R. \_\_\_\_\_  
Wenn ja, welche? ☐ s. R. \_\_\_\_\_
- 10 Haben Sie Ihren Hausarzt gewechselt oder sind Sie noch bei Dr. \_\_\_\_\_?  
☐ s.R. \_\_\_\_\_

Das sind schon alle meine Fragen. Vielen Dank für die Auskunft, Frau/Herr \_\_\_\_\_!  
Ich wünsche Ihnen (auch weiterhin) alles Gute und werde mich in 3 Monaten wieder telefonisch bei Ihnen melden. Sollten Sie noch weitere Fragen haben, können Sie mich gerne anrufen. Meine Telefonnummer ist \_\_\_\_\_.

Auf Wiederhören!

(s. R. = siehe Bemerkungen auf der Rückseite diese Blattes)

## 7. Publikationsliste

### Artikel:

1. Hübner U, Geisel J, Kirsch SH, Kruse V, Bodis M, Klein C, Herrmann W, Obeid R. Effect of 1 year B and D vitamin supplementation on LINE-1-repetitive-element methylation in older subjects. Clin Chem Lab Med 2013 Mar 1;51(3):649-55. doi: 10.1515/cclm-2012-0624
2. Herrmann W, Kirsch SH, Kruse V, Eckert R, Gräber S, Geisel J, Obeid R. One year B and D vitamins supplementation improves metabolic bone markers. Clin Chem Lab Med. 2013 Mar 1;51(3):639-47. doi: 10.1515/cclm-2012-0599

### Poster:

1. Kirsch SH, Herrmann W, Kruse V, Eckert R, Gräber S, Obeid R. Supplementation of folic acid (500 µg/d) over 1 year lowers homocysteine and increases serum and whole blood 5-methyltetrahydrofolate. 10<sup>th</sup> Annual Conference of the German Society for Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (DGKL). 23.09.-26.09.2013 in Mannheim, Germany. Published in Clin Chem Lab Med 2013;51[9]:A206-A270. No. P069.
2. Herrmann W, Kruse V, Kirsch SH, Gräber S, Eckert R, Obeid R. Effects of One Year D- and B-Vitamins Supplementation on Bone Metabolism. 9<sup>th</sup> Annual Conference of the German Society for Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (DGKL). 26.09.-29.09.2012 in Mannheim, Germany. Published in Clin Chem Lab Med 2012;50[9]:A206-A270. No. P54.
3. Hübner U, Obeid R, Kirsch SH, Kruse V, Bodis M, Herrmann W, Geisel J. The effects of B (folic acid, vitamins B12 and 6) + D vitamin supplementation on genomic DNA methylation. 9<sup>th</sup> Annual Conference of the German Society for Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (DGKL). 26.09.-29.09.2012 in Mannheim, Germany. Published in Clin Chem Lab Med 2012;50[9]:A206-A270. No. P30.
4. Kirsch SH, Herrmann W, Kruse V, Gräber S, Eckert R, Obeid R. Effect of one year D- and B-vitamins supplementation on bone metabolism. Advances and controversies in B-vitamins and choline. 04.-08.03.2012 in Leipzig, Germany. Published in Clin Chem Lab Med 2012;50[2]:A1-A69. No. WS9 03.

Wolfgang Herrmann\*, Susanne H. Kirsch, Vera Kruse, Rudolf Eckert, Stefan Gräber, Jürgen Geisel and Rima Obeid

# One year B and D vitamins supplementation improves metabolic bone markers

## Abstract

**Background:** Vitamin D and vitamin B deficiency are common in elderly subjects and are important risk factors for osteoporosis and age-related diseases. Supplementation with these vitamins is a promising preventative strategy. The objective of this study was to evaluate the effects of vitamins D3 and B supplementation on bone turnover and metabolism in elderly people.

**Methods:** Healthy subjects (n=93; >54 years) were randomly assigned to receive either daily vitamin D3 (1200 IU), folic acid (0.5 mg), vitamin B12 (0.5 mg), vitamin B6 (50 mg), and calcium carbonate (456 mg) (group A) or only vitamin D3 plus calcium carbonate (group B) in a double blind trial. We measured at baseline and after 6 and 12 months of supplementation vitamins, metabolites, and bone turnover markers.

**Results:** At baseline mean plasma 25-hydroxy vitamin D [25(OH)D] was low (40 or 30 nmol/L) and parathormone was high (63.7 or 77.9 pg/mL). 25(OH)D and parathormone correlated inversely. S-Adenosyl homocysteine and S-adenosyl methionine correlated with bone alkaline phosphatase, sclerostin, and parathormone. One year vitamin D3 or D3 and B supplementation increased plasma 25(OH)D by median 87.6% (group A) and 133.3% (group B). Parathormone was lowered by median 28.3% (A) and 41.2% (B), bone alkaline phosphatase decreased by 2.8% (A) and 16.2% (B), osteocalcin by 37.5% (A) and 49.4% (B), and tartrate-resistant-acid-phosphatase 5b by 6.1% (A) and 36.0% (B). Median total homocysteine (tHcy) was high at baseline (group A: 12.6, group B: 12.3  $\mu$ mol/L) and decreased by B vitamins (group A) to 8.9  $\mu$ mol/L (29.4%). tHcy lowering had no additional effect on bone turnover.

**Conclusions:** One year vitamin D3 supplementation with or without B vitamins decreased the bone turnover significantly. Vitamin D3 lowered parathormone. The additional application of B vitamins did not further improve bone turnover. The marked tHcy lowering by B vitamins may modulate the osteoporotic risk.

**Keywords:** B vitamins; bone alkaline phosphatase; deoxypyridoniline; homocysteine; osteocalcin; osteo-

porosis; parathormone; sclerostin; tartrate-resistant acid phosphatase; vitamin D.

**\*Corresponding author: Prof. Dr. Wolfgang Herrmann**, Department of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, Saarland University Hospital, Building 57, 66421 Homburg/Saar, Germany, Phone: +49 68411630701, Fax: +49 68411630703, E-mail: prof.wolfgang.herrmann@uks.eu

**Susanne H. Kirsch, Vera Kruse, Jürgen Geisel and Rima Obeid:**

Department of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, Saarland University Hospital, Homburg/Saar, Germany  
**Rudolf Eckert:** Geriatric Center, Marienkrankenhaus, St. Wendel, Germany

**Stefan Gräber:** Department of Medical Biometry, Epidemiology, and Medical Informatics, Saarland University Hospital, Homburg/Saar, Germany

## Introduction

Osteoporosis is common in elderly individuals and can cause serious disabilities and affected persons require extensive health care [1, 2]. Vitamin D3 plays a central role in bone mineralization by regulating calcium carbonate (Ca) and phosphate metabolism [3]. Vitamin D deficiency leads to secondary hyperparathyroidism, increased bone turnover, rickets, osteoporosis, mild osteomalacia, and increases fracture risk [4, 5]. Vitamin D deficiency also has been linked to a broad variety of independent diseases like colon-, prostate-, and breast cancer, autoimmune diseases, infectious diseases, cardiovascular diseases, and hypertension [6–8].

Approximately 1 billion people worldwide are thought to be vitamin D deficient or insufficient [9]. About 50% of elderly individuals ( $\geq 65$  years) or young individuals [10, 11] in industrialized countries are vitamin D deficient or insufficient. Additionally, elderly people also have a high prevalence of B vitamin deficiency leading to hyperhomocysteinemia (HHcy) which is also considered as important risk factor for osteoporosis and bone fracture [12, 13].

At present, there is no agreement on the optimal dietary intake and serum level of vitamin D required to protect against diseases. Recent evidence suggests that

a protective intake might be five-fold above the recommended dietary allowance (RDA) for vitamin D that is 1000 IU daily [7, 14]. Studies have used various biomarkers to define vitamin D sufficiency, such as changes in parathormone (PTH) concentrations and effects on bone metabolism [15, 16]. Since intestinal Ca absorption increases when 25-hydroxy vitamin D [25(OH)D] levels rise from 50 to 75 nmol/L, this range has been classified as relative vitamin D deficiency. Levels below <50 nmol/L are considered as deficient, and those >75 nmol/L indicate a sufficient vitamin D supply.

The National Health and Nutrition Examination Survey III (NHANES III), which included 13,432 younger (20–49 years) and older (>50 years) persons reported an association between vitamin D and bone mineral density (BMD) [17]. Higher serum 25(OH)D concentrations were associated with higher BMD. Other large epidemiologic studies also have shown a significant association between serum 25(OH)D and hip fractures in elderly individuals [18, 19]. Vitamin D3 supplementation has been shown to decrease PTH levels, to temper the elevations of biochemical bone turnover markers, and to increase BMD [20]. The beneficial effects of vitamin D3 supplementation have been attributed to the suppression of secondary hyperparathyroidism [21].

Recent studies have linked high concentrations of plasma total homocysteine (tHcy) and low vitamin B12 to low BMD and fragility fractures, typical symptoms of osteoporosis [22–25]. Experimental *in vivo* and *in vitro* studies suggest direct effects of tHcy on bone and bone metabolism [26–28]. HHcy increases the fracture risk, but has minor effects on the BMD [12, 23, 25]. Biochemical bone turnover markers indicated a shift of bone metabolism towards bone resorption under HHcy [12, 22, 24, 29]. Studies on human osteoclasts revealed a distinct activation of osteoclasts with decreasing concentrations of folate, vitamins B6, and B12 [26]. Carmel et al. [30] reported lower concentrations of the bone formation markers: bone specific alkaline phosphatase (BAP) and osteocalcin (OC) in vitamin B12 deficient patients compared with controls. tHcy has been found to accumulate in bone by collagen binding [31]. Additionally, HHcy seems to have adverse effects on extracellular bone matrix by disturbing collagen cross-linking [31, 32]. Few *in vivo* studies tested the effect of B vitamins supplementation on fracture risk, BMD, and bone turnover [12]. The importance of B vitamins for bone health has been supported by studies on patients with pernicious anemia who exhibited low BMD, increased fracture rate, and accelerated bone turnover [33, 34]. Vegetarians are known for their low vitamin B12 status and were reported to have higher plasma concentrations

of the bone turnover markers [29]. Some studies reported decreased BMD in vegetarians [34, 35] others did not [36]. Studies testing the combined effect of B and D vitamins on bone metabolic markers are scarce. Sclerostin, a marker of the recently identified bone metabolic pathways, has not been tested after treatment with vitamin D or B. The current study aims to investigate the effect of 1 year D vitamin or D plus B vitamins supplementation on bone metabolism in older individuals.

## Materials and methods

### Study design

The study was a randomized and double blind trial. The study was performed between August 2009 and August 2010 at the Saarland University Hospital, Homburg, Germany. The randomization was performed by the institute of Medical Biometry using a computer program. Inclusion criteria were: older adults (>50 years), males or females. Exclusion criteria were: renal dysfunction, recent stroke or coronary event within the last 3 months, current cancer, antifolate treatment, ileum resection, existing B vitamins supplementation, megaloblastic anemia, and osteoporotic patients treated with pharmacological doses of vitamin D or antisteoporotic drugs. Termination criteria were: indication for a high-dose vitamin B supplementation, coronary or vascular event, or surgical procedures during the study.

A total of 111 subjects from a coronary rehabilitation sport program, from the Geriatric Rehabilitation Center in St. Ingbert, Germany, and from an announcement in a local newspaper were recruited for the study out of which 93 were eligible to participate. Group A consisted of 48 subjects [median age (10th–90th percentiles): 68 (54–83) years, 15 males] and group B consisted of 45 subjects [median age (10th–90th percentiles): 71 (58–86) years, 24 males]. A total of 65 subjects completed the study.

The group A received daily 500 µg folic acid, plus 500 µg vitamin B12, 50 mg vitamin B6, 456 mg Ca, and 1200 IU vitamin D3. Group B received 456 mg Ca, and 1200 IU vitamin D3. Fasting blood and urine samples were collected at baseline, after 6 and 12 months of supplementation. The Local Ethics Commission of the Saarland approved the study and all participants signed informed consent documents.

### Blood sampling and analyte determination

Fasting blood samples were collected by venous puncture either in tubes without anticoagulant or in tubes containing EDTA. Blood samples without anticoagulant were allowed to clot for 30 min at room temperature and were centrifuged for 10 min at 2000 g and 4°C. Plasma samples were centrifuged within 30 min for 10 min at 2000 g and 4°C. Serum and plasma were immediately separated and divided into several aliquots. For S-adenosyl homocysteine (SAH) and S-adenosyl methionine (SAM) measurements, 500 µL EDTA plasma was acidified with 50 µL 1 N acetic acid and mixed thoroughly. A 10 mL second



morning urine sample was also collected. All blood and urine samples were then immediately stored at  $-70^{\circ}\text{C}$  until analysis.

The serum concentrations of OC, BAP, tartrate-resistant-acid-phosphatase 5b (TRAP5b), and urinary concentrations of deoxypyridonoline (DPD) were quantified using the enzymatic immunoassays from MicroVue (Quidel Corporation, San Diego, CA, USA). Concentration of intact PTH in plasma was measured using an enzymatic immunoassay (Biomerica Inc, Irvine, CA, USA). Serum concentration of sclerostin was measured using the enzymatic immunoassay from TECO (TECO medicals AG, Sissach, Switzerland). The quantification of 25(OH)D at baseline and after 12 months of supplementation was carried out using the Immun-Liaison system (DiaSorin Deutschland GmbH, Dietzenbach, Germany). The quantification of tHcy and methylmalonic acid (MMA) was performed by a modified GC-MS method according to Stabler et al. [37]. The quantification of total vitamin B12 was performed using a chemiluminescent immunoassay performed on the ADVIA Centaur XP System platform. The determination of holoTC was performed using a micro particle enzyme immunoassay (Abbott Diagnostics, Vienna, Austria). SAH and SAM were quantified by ultra-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) [38]. Serum 5-methyltetrahydrofolate (5-methylTHF) was determined using UPLC-MS/MS method [39]. Creatinine in urine was determined using the Cobas system (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany). Urinary DPD concentrations were corrected for urinary creatinine.

## Calculations and statistics

Statistical analyses were performed using SPSS (Statistical Package for the Social Sciences, version 19.0). Results are shown as median (10th–90th percentile). The differences in continuous variables between two independent groups were tested by the Mann-Whitney U-test, differences between categorical variables were tested by the  $\chi^2$ -test. The paired t-test was used for comparing differences between two paired variables in one treatment group. The Spearman's rho test was used for testing the correlations between different variables. p-Values  $<0.05$  were considered statistically significant.

## Results

The baseline characteristics of study subjects according to treatment arms are shown in Table 1. Age and body mass index (BMI) were comparable between the groups. Four of the participants (two in group A, two in group B) had diabetes mellitus type 2. The concentrations of vitamins and related metabolites at baseline and after 6 and 12 months are shown in Table 2. At baseline median concentrations of plasma tHcy was abnormally high while 25(OH)D was abnormally low. The effect of B vitamin supplementation in group A is demonstrated in Table 2. Plasma tHcy remained unchanged in group B that received no B vitamins. The concentrations of tHcy were normalized in group A at 6 months and seemed to reach a steady state, since no further lowering was achieved in the following 6 months. Concentrations of vitamin B12 and folate significantly increased in group A at 6 and 12 months (Table 2). No significant changes in concentrations of MMA or SAH and SAM were found in both study arms (Table 2).

Concentrations of vitamin D, bone turnover markers, and hormones before and after supplementation are depicted in Table 3. There were no significant differences in all of the measured biomarkers between the two study groups at baseline. In both groups, median concentrations of vitamin D were in the insufficiency range and were associated with elevated PTH concentrations at baseline. One year supplementation with 1200 IU vitamin D3/day caused an increase of vitamin D concentrations in group A (from 40 to 75 nmol/L) and in group B (from 30 to 70 nmol/L) (Table 2). PTH concentrations were lowered

Variable	Group A (B, D, Ca) n=48	Group B (D, Ca) n=45	p-Value
Age, years	68.0 (54.2–82.8)	70.5 (58.0–85.6)	0.089
Weight, kg	76.0 (59.0–96.6)	70.0 (56.0–98.0)	0.720
Females, n (%)	33 (69%)	21 (47%)	0.037 <sup>a</sup>
Alcohol consumption, n (%)	21 (44%)	16 (35%)	0.530 <sup>a</sup>
Statin therapy, n (%)	9 (19%)	11 (24%)	0.616 <sup>a</sup>
Serum creatinine, $\mu\text{mol/L}$	70.72 (53.0–113.2)	79.6 (53.0–114.0)	0.867
Glucose, mmol/L	5.77 (5.22–6.88)	5.88 (4.88–7.60)	0.590
CRP, mg/L	1.50 (0.60–5.28)	1.05 (0.60–4.78)	0.211
Total cholesterol, mmol/L	5.38 (3.85–6.57)	5.17 (3.67–6.75)	0.688
HDL cholesterol, mmol/L	1.45 (0.96–2.17)	1.42 (0.85–2.43)	0.561
LDL cholesterol, mmol/L	3.39 (2.43–4.34)	3.26 (1.78–4.47)	0.668
Triglycerides, mmol/L	1.14 (0.68–1.86)	1.31 (0.72–3.17)	0.279

**Table 1** Characteristics of all study participants according to treatment arm.

The data are medians (10th–90th percentiles). p-Values are according to the Mann-Whitney U-test. <sup>a</sup>p-Values are according to the  $\chi^2$ -test. Group A: 500  $\mu\text{g}$  folic acid, 500  $\mu\text{g}$  B12, 50 mg B6, 456 mg Ca, and 1200 IU D3/day. Group B: 456 mg Ca and 1200 IU D3/day. CRP, C-reactive protein; HDL, high density lipoprotein; LDL, low density lipoprotein.



Compound	Group A (B, D, Ca)	Group B (D, Ca)	p-Value
Baseline concentrations, reference range			
25(OH)D, nmol/L (>75)	40 (13–65)	30 (12–67)	0.813
Vitamin B12, pmol/L (156–672)	280 (176–495)	288 (190–425)	0.752
HoloTC, pmol/L ( $\geq 35$ )	53 (35–79)	47 (26–85)	0.288
MMA, nmol/L ( $\leq 271$ )	212 (142–402)	212 (126–388)	0.916
tHcy, $\mu$ mol/L ( $< 12.0$ )	12.9 (8.7–20.4)	13.0 (8.6–21.3)	0.968
5-MethylTHF, nmol/L (5.6–26.7)	14.0 (5.0–36.9)	15.4 (3.4–47.8)	0.721
SAH, nmol/L (9.1–20)	17.6 (11.9–29.2)	18.3 (10.8–33.1)	0.508
SAM, nmol/L (82–106)	121 (88–167)	116 (95–178)	0.821
After 6 months			
Vitamin B12, pmol/L	405 (277–848)	260 (197–436)	<b>&lt;0.001</b>
HoloTC, pmol/L	150 (73–150)	77 (35–126)	<b>&lt;0.001</b>
MMA, nmol/L	275 (209–391)	285 (162–514)	0.869
tHcy, $\mu$ mol/L	8.9 (7.1–14.1)	13.1 (9.4–20.9)	<b>&lt;0.001</b>
5-MethylTHF, nmol/L	47.5 (29.4–73.6)	16.8 (7.4–36.7)	<b>&lt;0.001</b>
SAH, nmol/L	16.5 (10.6–34.1)	17.3 (8.6–29.9)	0.662
SAM, nmol/L	126 (98–188)	115 (91–151)	<b>0.029</b>
After 12 months			
25(OH)D, nmol/L	75 (47–105)	70 (47–107)	0.844
Vitamin B12, pmol/L	459 (316–862)	261 (169–360)	<b>&lt;0.001</b>
MMA, nmol/L	212 (146–303)	237 (143–478)	0.203
tHcy, $\mu$ mol/L	9.1 (6.0–14.1)	14.9 (8.7–28.5)	<b>&lt;0.001</b>
5-MethylTHF, nmol/L	46.1 (18.9–69.7)	13.9 (5.5–35.5)	<b>&lt;0.001</b>
SAH, nmol/L	18.4 (11.4–41.9)	18.9 (11.3–41.2)	0.646
SAM, nmol/L	120 (92–196)	120 (79–159)	0.250

**Table 2** Vitamins and related metabolites at baseline, after 6 and after 12 months of supplementation (per protocol).

The data are medians (10th–90th percentiles). p-Values are according to the Mann-Whitney U-test. Significant p-values are shown in bold. Group A: 500  $\mu$ g folic acid, 500  $\mu$ g B12, 50 mg B6, 456 mg Ca, and 1200 IU D3/day. Group A consisted of 48 subjects at baseline, 35 subjects after 6 months, and 34 subjects after 12 months. Group B: 456 mg Ca and 1200 IU D3/day. Group B consisted of 45 subjects at baseline and 31 subjects after 6 and 12 months. HoloTC, holotranscobalamin; MMA, methylmalonic acid; SAH, S-adenosyl homocysteine; SAM, S-adenosyl methionine; tHcy, total homocysteine.

after 6 months of vitamin D supplementation, confirming that PTH elevation was caused by vitamin D deficiency.

The bone resorption markers (TRAP5b, DPD), the bone formation markers (OC, BAP), and sclerostin that inhibits osteoblast activity showed significant and comparable changes in both treatment arms, suggesting that this effect was caused by vitamin D3 (Figure 1 and Table 3). The bone formation marker OC decreased in both vitamin treatment arms significantly by 45.1% in group A and 35.6% in group B (median changes compared to baseline in group A=3.3 and in group B=4.1 ng/mL); BAP decreased less by 2.8% (median 0.7 U/L) and 16.2% (4.8 U/L). The bone resorption marker TRAP5b was significantly lowered after 1 year vitamin therapy in both treatment groups by median 0.13 U/L (6.1%) in group A and 0.87 U/L (36.0%) in group B while DPD showed less changes. Sclerostin is a delayed secreted product of osteocytes and inhibits bone formation. Sclerostin concentrations increased after 1 year vitamin D3 supplementation by median of 0.12 ng/mL (21.4%) in group A and 0.20 ng/mL (37.7%) in group B.

The correlations of bone turnover markers, vitamins, and metabolites at baseline are presented in Table 4. Inverse correlations were found between plasma concentrations of PTH and 25(OH)D and between PTH and DPD. Concentrations of the bone formation markers OC and BAP correlated with that of the bone resorption marker TRAP5b ( $p=0.001$ ). Additionally, concentrations of OC and DPD were directly correlated.

The vitamin markers also showed correlations with some bone markers. For example, concentrations of holoTC correlated with that of BAP and sclerostin. Furthermore, the bone formation markers OC and BAP as well as sclerostin showed significant correlations with the vitamin B12 markers holoTC or MMA. Interestingly, concentrations of SAH and SAM showed significant correlations with concentrations of BAP, sclerostin (Figure 2), and PTH.

After 1 year of treatment with B and D vitamins, BAP correlated significantly with the bone resorption marker DPD in group A. Furthermore, plasma tHcy (group A), SAH (groups A and B), and SAM (group A) correlated with

Analyte	Baseline	After 6 months	p-Value (Baseline vs. 6 M)	After 12 months	p-Value (Baseline vs. 12 M)
Group A (B, D, Ca)					
PTH, pg/mL	63.7 (29.9–133.5)	46.1 (35.3–79.6)	<b>&lt;0.001</b>	45.7 (23.4–71.5)	<b>&lt;0.001</b>
BAP, U/L	24.8 (17.2–51.4)	22.9 (15.3–41.8)	<b>0.001</b>	24.1 (14.3–43.0)	<b>0.040</b>
OC, ng/mL	8.8 (5.7–12.1)	7.7 (3.8–12.2)	0.139	5.5 (2.7–9.8)	<b>0.002</b>
TRAP5b, U/L	2.13 (1.18–4.9)	2.39 (1.02–3.84)	0.627	2.00 (0.86–3.39)	0.189
Sclerostin, ng/mL	0.56 (0.35–0.84)	0.65 (0.37–1.07)	<b>&lt;0.001</b>	0.68 (0.48–1.28)	<b>&lt;0.001</b>
DPD, nmol/mmol creatinine	6.8 (3.8–10.4)	6.4 (4.0–9.9)	0.200	7.0 (4.1–11.1)	0.149
Group B (D, Ca)					
PTH, pg/mL	77.9 (37.9–156.9)	44.2 (29.5–87.4)	<b>&lt;0.001</b>	45.8 (24.2–112.9)	<b>&lt;0.001</b>
BAP, U/L	29.6 (18.7–41.9)	22.4 (16.4–40.1)	<b>0.018</b>	24.8 (16.5–39.2)	<b>0.019</b>
OC, ng/mL	8.3 (5.5–12.3)	7.3 (3.4–14.7)	0.419	4.2 (2.7–11.9)	<b>&lt;0.001</b>
TRAP5b, U/L	2.42 (1.47–5.11)	2.17 (1.41–5.0)	0.604	1.55 (0.87–3.18)	<b>&lt;0.001</b>
Sclerostin, ng/mL	0.53 (0.39–0.92)	0.64 (0.46–1.09)	<b>&lt;0.001</b>	0.73 (0.46–1.18)	<b>0.002</b>
DPD, nmol/mmol creatinine	5.8 (3.7–8.4)	6.6 (3.8–10.5)	0.142	5.6 (3.9–10.5)	0.959

**Table 3** Bone turnover markers of all study participants.

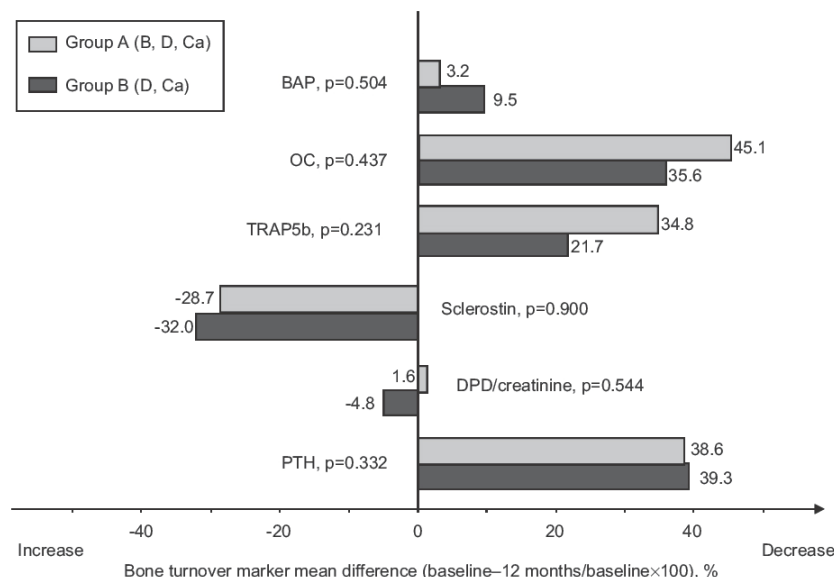
The data are presented as medians (10th–90th percentiles). p-Values were calculated according to the paired t-test. Significant p-values are shown in bold. Group A: 500 µg folic acid, 500 µg B12, 50 mg B6, 456 mg Ca, and 1200 IU D3/day. Group A consisted of 48 subjects at baseline, 35 subjects after 6 months, and 34 subjects after 12 months. Group B: 456 mg Ca and 1200 IU D3/day. Group B consisted of 45 subjects at baseline and 31 subjects after 6 and 12 months.

sclerostin. SAM correlated also with the bone formation marker BAP in group A.

## Discussion

The relationship between low vitamin D levels and fracture risk or BMD has been established [17, 18]. Observational

studies showed also an association between HHcy and bone fracture risk. Senile bone loss is accentuated by subtle chronic secondary hyperparathyroidism resulting from vitamin D deficiency [20, 40]. Vitamin D3 supplementation decreases PTH levels, influences bone turnover, and increases BMD [20]. Vitamin D3 has also been shown to protect against hip fractures [41]. The beneficial effects of vitamin D3 supplementation have been attributed to the suppression of secondary hyperparathyroidism [21].



**Figure 1** Percentage changes of the mean bone turnover markers from baseline. p-Values were calculated using the Mann-Whitney U-test (group A vs. group B).

	OC	BAP	TRAP5b	Sclerostin	DPD	PTH
PTH					-0.280	
OC			0.417		0.341	
BAP			0.565			
TRAP5b					0.390	
SAH		0.442		0.362		0.295
SAM		0.266		0.413		0.309
25(OH)D						-0.486
MMA	0.262					
HoloTC		0.302		0.270		

**Table 4** Correlations of bone markers at baseline in all participants. Correlation analysis according to the Spearman's rho test. Data are correlation coefficients. Only significant correlations are shown.

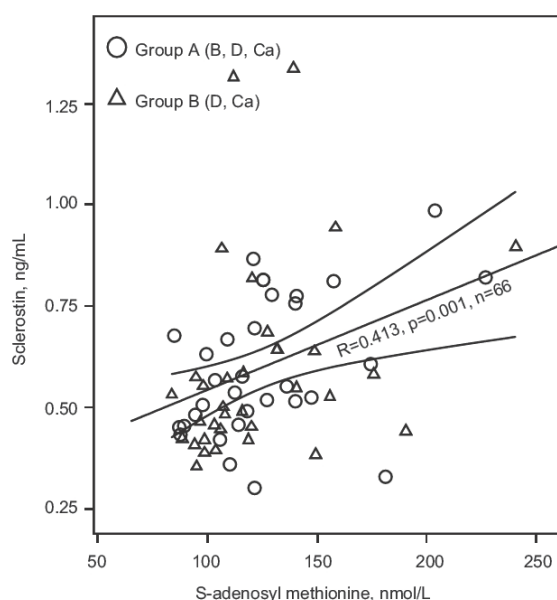
The role of HHcy in bone metabolism is less clear and data is available only from experimental HHcy. However, long-term intervention studies showing the effect of vitamin D or B supplements on bone metabolism can explain the role of these vitamins in bone turnover.

In the current study we found that secondary hyperparathyroidism was reversible after supplementation of daily 1200 IU vitamin D3. The effect of vitamin D on PTH was significant after 6 months and no further decrease in PTH was found in the following 6 months. A simultaneous response of BAP concentrations was evident after 6 months in both groups. The response of OC concentrations was delayed and a significant reduction was observed at 12 months, but not at 6 months. The changes

of bone formation markers were comparable in both study arms, independent of B vitamin supplementation (Figure 1). The bone resorption markers TRAP5b and DPD showed no significant changes in both groups after 6 months of supplementation. However, only TRAP5b was significantly lowered after 12 months (Table 3). These findings strongly suggest that the effect of vitamin D3 supplementation takes place first on the level of bone formation. Enhancement of bone formation might be followed by a delayed and less pronounced enhancement in bone resorption markers. Only TRAP5b but not DPD was significantly lowered by 1 year vitamin D3 supplementation in group B.

Sclerostin is a glycoprotein that is highly expressed in osteocytes. Sclerostin is a member of the DAN family (differential screening-selected aberrant in neuroblastoma) and antagonizes the activity of bone morphogenetic protein (BMP) and/or wingless proteins (Wnt) thus blocking the Wnt-signaling cascade [42]. In that way sclerostin inhibits differentiation and activity of osteoblasts and promotes their apoptosis. Sclerostin expression is inhibited by PTH. According to this, lowering PTH after vitamin D supplementation in our study caused an increase in sclerostin. Studies dealing with the effect of vitamin D3 supplementation on sclerostin are not available. Recently, Mirza et al. reported an inverse correlation between sclerostin and PTH in one study on postmenopausal women [43]. Another recent study has shown that sclerostin concentrations were lowered after 18 months of treatment with PTH [44]. In another study on postmenopausal osteoporotic women, Gatti et al. reported an increase of sclerostin by approximately 30% after 36 months of treatment with monoclonal antibody against RANKL (receptor activator of nuclear factor  $\kappa$ B ligand) [45]. These results collectively suggest that vitamin D deficiency enhances the anabolic effect by increasing PTH that in turn decreases sclerostin. In contrast, lower PTH caused by vitamin D3 supplements is followed by a decrease of bone turnover [20].

In a placebo controlled study on 330 elderly women, a vitamin D3 400 IU/day supplementation led to a significant decrease in PTH, but almost no change in serum OC after 2 years [46]. The combination of vitamin D3 and Ca may have a greater suppressing effect on bone turnover. A 6 weeks' course of vitamin D3 (1000 IU/day) and Ca (1500 mg/day) in older women caused a 20% decrease of serum OC, a 50% decrease of urinary N-telopeptide, and a 10% decrease of BAP [47]. This is in line with our study, where 1 year daily supplementation of 1200 IU vitamin D3 and 456 mg Ca decreased the bone formation marker OC by 45.1% in group A and 35.6% in group B.



**Figure 2** Correlation of SAM and sclerostin at baseline. p-Values were calculated using the Spearman's rho test.



The extent of PTH lowering seems to drive the subsequent changes in bone metabolic markers. In a study on older bedridden patients with vitamin D deficiency, vitamin D3 400 IU or 1200 IU plus 500 mg Ca supplementation over 6 months resulted in 124%–200% increase in serum vitamin D concentrations, and only 7%–8% decrease in PTH, but almost no change in bone formation marker PINP (amino-terminal propeptide of type I collagen) and bone resorption marker ICTP (carboxy-terminal telopeptide of type I collagen) [21]. In a further study on children on a vegetarian diet, supplementation of vitamin D3 400 IU and Ca 500 mg/day over 4 months did not significantly change the bone formation marker OC and the bone resorption marker TRAP5b [48]. The differences between the studies are probably related to the vitamin D3 dose used, the duration of the supplement, and specific differences related to growth phases or osteoporotic changes in elderly people. Our study on elderly subjects has shown that 6 months were not sufficient to induce significant changes in certain markers.

HHcy and low B vitamins influence bone metabolism directly by stimulation of osteoclast activity while osteoblast activity was less affected [26–28, 49, 50]. In the current study, median concentration of tHcy was lowered from 12.6 to 8.9  $\mu\text{mol/L}$  in the group that received the B vitamins. Few studies tested the effect of B vitamins on bone formation and resorption markers [12]. In the current study, compared to vitamin D and Ca adding B vitamins had no additional effects in term of changing the bone markers. Our results are in line with earlier clinical trials where no effect of B vitamins supplementation (1 and 2.5 mg folic acid, 0.5 mg vitamin B12, and 10 or 25 mg vitamin B6) on bone metabolism was found after 1 or 2 years [51, 52]. However, subjects with tHcy concentrations  $>15 \mu\text{mol/L}$  showed an increase in BMD at the lumbar spine, and a decrease in OC and PINP concentrations by approximately 50% after B vitamins treatment [51]. Similarly, a large scale double blind placebo controlled intervention trial by Sato et al. demonstrated a 75% reduction of fracture risk and an improvement of BMD in a 2-year supplementation of folic acid and vitamin B12 in 628 hemiplegic stroke patients with plasma tHcy at baseline of  $19.9 \mu\text{mol/L}$  [53]. Interestingly, SAH and SAM but not tHcy

correlated significantly with BAP, sclerostin, and PTH at baseline (Table 4) suggesting that SAH rather than tHcy may be related to active bone turnover. Collectively, these results suggest that adding B vitamins to vitamin D and Ca can be beneficial for people with HHcy (or elevated SAH) and those treated for  $>1$  year.

Furthermore, tHcy has been found to accumulate in bone by collagen binding and HHcy seems to have adverse effects on extracellular bone matrix by disturbing collagen cross-linking [31, 32]. It has been reported that B vitamin deficiency is linked to a decrease in enzymatic cross-links and an increase in non-enzymatic cross-links in human bone [54]. Therefore, existing data suggest that HHcy and possibly B vitamin deficiencies adversely affect bone quality by a stimulation of bone resorption and disturbance of collagen cross-linking.

In conclusion, 1 year supplementation with vitamin D3 and Ca in combination with B vitamins (group A) or without B vitamins (group B) resulted in both groups in a significant and nearly identical reduction in bone turnover indicated by bone formation as well as bone resorption markers. The vitamin D3 dosage of 1200 IU/day reduced PTH concentrations. The decrease in PTH and BAP was observed after 6 months, the decrease in OC and TRAP5b was significant after 1 year of supplementation. Supplementing B vitamins did not exert further changes in bone turnover markers that we tested. However, the marked lowering of tHcy (especially in individuals with HHcy) may improve collagen cross-linking and may in this way contribute to improved bone stability.

## Conflict of interest statement

**Authors' conflict of interest disclosure:** The authors stated that there are no conflicts of interest regarding the publication of this article.

**Research funding:** None declared.

**Employment or leadership:** None declared.

**Honorarium:** None declared.

Received September 12, 2012; accepted October 4, 2012; previously published online November 21, 2012

## References

1. Herrmann M, Duque G. Vitamin D and bone health. In: Herrmann W, Obeid R, editors. *Vitamins in the prevention of human diseases*, 1st ed. Berlin/New York: Walter de Gruyter, 2011: 429–55.
2. Cummings SR, Melton LJ. Epidemiology and outcomes of osteoporotic fractures. *Lancet* 2002;359:1761–7.
3. Suda T, Ueno Y, Fujii K, Shinki T. Vitamin D and bone. *J Cell Biochem* 2003;88:259–66.

4. Barnes MS, Robson PJ, Bonham MP, Strain JJ, Wallace JM. Effect of vitamin D supplementation on vitamin D status and bone turnover markers in young adults. *Eur J Clin Nutr* 2006;60:727–33.
5. Hutchison FN, Bell NH. Osteomalacia and rickets. *Semin Nephrol* 1992;12:127–45.
6. Grant WB. Solar ultraviolet irradiance and cancer incidence and mortality. *Adv Exp Med Biol* 2008;624:16–30.
7. Reichrath J. Using vitamin D for management of human diseases. In: Herrmann W, Obeid R, editors. *Vitamins in the prevention of human diseases*, 1st ed. Berlin/New York: Walter de Gruyter, 2011:399–409.
8. Zittermann A. Potential health effects of vitamin D. In: Herrmann W, Obeid R, editors. *Vitamins in the prevention of human diseases*, 1st ed. Berlin/New York: Walter de Gruyter, 2011:380–95.
9. Holick MF. Vitamin D deficiency. *N Engl J Med* 2007;357:266–81.
10. Gordon CM, DePeter KC, Feldman HA, Grace E, Emans SJ. Prevalence of vitamin D deficiency among healthy adolescents. *Arch Pediatr Adolesc Med* 2004;158:531–7.
11. Sullivan SS, Kushida CA. Multiple sleep latency test and maintenance of wakefulness test. *Chest* 2008;134:854–61.
12. Herrmann M, Peter SJ, Umanskaya N, Wagner A, Taban-Shomal O, Widmann T, et al. The role of hyperhomocysteinemia as well as folate, vitamin B(6) and B(12) deficiencies in osteoporosis: a systematic review. *Clin Chem Lab Med* 2007;45:1621–32.
13. Herrmann W. The importance of hyperhomocysteinemia as a risk factor for diseases: an overview. *Clin Chem Lab Med* 2001;39:666–74.
14. Vieth R. Vitamin D supplementation, 25-hydroxyvitamin D concentrations, and safety. *Am J Clin Nutr* 1999;69:842–56.
15. Lips P, Wiersinga A, van Ginkel FC, Jongen MJ, Netelenbos JC, Hackeng WH, et al. The effect of vitamin D supplementation on vitamin D status and parathyroid function in elderly subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 1988;67:644–50.
16. Bates CJ, Carter GD, Mishra GD, O'Shea D, Jones J, Prentice A. In a population study, can parathyroid hormone aid the definition of adequate vitamin D status? A study of people aged 65 years and over from the British National Diet and Nutrition Survey. *Osteoporos Int* 2003;14:152–9.
17. Bischoff-Ferrari HA, Dietrich T, Orav EJ, Dawson-Hughes B. Positive association between 25-hydroxy vitamin D levels and bone mineral density: a population-based study of younger and older adults. *Am J Med* 2004;116:634–9.
18. Cauley JA, Lacroix AZ, Wu L, Horwitz M, Danielson ME, Bauer DC, et al. Serum 25-hydroxyvitamin D concentrations and risk for hip fractures. *Ann Intern Med* 2008;149:242–50.
19. Looker AC, Mussolino ME. Serum 25-hydroxyvitamin D and hip fracture risk in older U.S. white adults. *J Bone Miner Res* 2008;23:143–50.
20. Lips P. Vitamin D deficiency and secondary hyperparathyroidism in the elderly: consequences for bone loss and fractures and therapeutic implications. *Endocr Rev* 2001;22:477–501.
21. Bjorkman M, Sorva A, Risteli J, Tilvis R. Vitamin D supplementation has minor effects on parathyroid hormone and bone turnover markers in vitamin D-deficient bedridden older patients. *Age Ageing* 2008;37:25–31.
22. Dhonukshe-Rutten RA, Pluijm SM, de Groot LC, Lips P, Smit JH, van Staveren WA. Homocysteine and vitamin B12 status relate to bone turnover markers, broadband ultrasound attenuation, and fractures in healthy elderly people. *J Bone Miner Res* 2005;20:921–9.
23. McLean RR, Jacques PF, Selhub J, Tucker KL, Samelson EJ, Broe KE, et al. Homocysteine as a predictive factor for hip fracture in older persons. *N Engl J Med* 2004;350:2042–9.
24. Herrmann M, Kraenzlin M, Pape G, Sand-Hill M, Herrmann W. Relation between homocysteine and biochemical bone turnover markers and bone mineral density in peri- and post-menopausal women. *Clin Chem Lab Med* 2005;43:1118–23.
25. van Meurs JB, Dhonukshe-Rutten RA, Pluijm SM, van der Klift M, de Jonge R, Lindemans J, et al. Homocysteine levels and the risk of osteoporotic fracture. *N Engl J Med* 2004;350:2033–41.
26. Herrmann M, Schmidt J, Umanskaya N, Colaizzi G, Al-Marrawi F, Widmann T, et al. Stimulation of osteoclast activity by low B-vitamin concentrations. *Bone* 2007;41:584–91.
27. Herrmann M, Umanskaya N, Wildemann B, Colaizzi G, Widmann T, Zallone A, et al. Stimulation of osteoblast activity by homocysteine. *J Cell Mol Med* 2008;12:1205–10.
28. Ozdem S, Samanci S, Tasatargil A, Yildiz A, Sadan G, Donmez L, et al. Experimental hyperhomocysteinemia disturbs bone metabolism in rats. *Scand J Clin Lab Invest* 2007;67:748–56.
29. Herrmann W, Obeid R, Schorr H, Hubner U, Geisel J, Sand-Hill M, et al. Enhanced bone metabolism in vegetarians – the role of vitamin B12 deficiency. *Clin Chem Lab Med* 2009;47:1381–7.
30. Carmel R, Lau KH, Baylink DJ, Saxena S, Singer FR. Cobalamin and osteoblast-specific proteins. *N Engl J Med* 1988;319:70–5.
31. Holstein JH, Herrmann M, Splett C, Herrmann W, Garcia P, Histing T, et al. High bone concentrations of homocysteine are associated with altered bone morphology in humans. *Br J Nutr* 2011;106:378–82.
32. Herrmann M, Tami A, Wildemann B, Wolny M, Wagner A, Schorr H, et al. Hyperhomocysteinemia induces a tissue specific accumulation of homocysteine in bone by collagen binding and adversely affects bone. *Bone* 2009;44:467–75.
33. Goerss JB, Kim CH, Atkinson EJ, Eastell R, O'Fallon WM, Melton LJ, III. Risk of fractures in patients with pernicious anemia. *J Bone Miner Res* 1992;7:573–9.
34. Appleby P, Roddam A, Allen N, Key T. Comparative fracture risk in vegetarians and nonvegetarians in EPIC-Oxford. *Eur J Clin Nutr* 2007;61:1400–6.
35. Dhonukshe-Rutten RA, van Dusseldorp M, Schneede J, de Groot LC, van Staveren WA. Low bone mineral density and bone mineral content are associated with low cobalamin status in adolescents. *Eur J Nutr* 2005;44:341–7.
36. Wang YF, Chiu JS, Chuang MH, Chiu JE, Lin CL. Bone mineral density of vegetarian and non-vegetarian adults in Taiwan. *Asia Pac J Clin Nutr* 2008;17:101–6.
37. Stabler SP, Lindenbaum J, Savage DG, Allen RH. Elevation of serum cystathionine levels in patients with cobalamin and folate deficiency. *Blood* 1993;81:3404–13.
38. Kirsch SH, Knapp JP, Geisel J, Herrmann W, Obeid R. Simultaneous quantification of S-adenosyl methionine and S-adenosyl homocysteine in human plasma by stable-isotope dilution ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2009;877:3865–70.
39. Kirsch SH, Knapp JP, Herrmann W, Obeid R. Quantification of key folate forms in serum using stable-isotope dilution ultra performance liquid chromatography-tandem mass

- spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2010;878:68–75.
40. Need AG. Bone resorption markers in vitamin D insufficiency. *Clin Chim Acta* 2006;368:48–52.
  41. Bischoff-Ferrari H, Stahelin HB, Walter P. Vitamin D effects on bone and muscle. *Int J Vitam Nutr Res* 2011;81:264–72.
  42. Moester MJ, Papapoulos SE, Lowik CW, van Bezooijen RL. Sclerostin: current knowledge and future perspectives. *Calcif Tissue Int* 2010;87:99–107.
  43. Mirza FS, Padhi ID, Raisz LG, Lorenzo JA. Serum sclerostin levels negatively correlate with parathyroid hormone levels and free estrogen index in postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab* 2010;95:1991–7.
  44. Piemonte S, Romagnoli E, Bratengeier C, Woloszczuk W, Tancredi A, Pepe J, et al. Serum sclerostin levels decline in postmenopausal women with osteoporosis following treatment with intermittent PTH. *J Endocrinol Invest* 2012; DOI:10.3275/8522.
  45. Gatti D, Viapiana O, Fracassi E, Idolazzi L, Dartizio C, Povino MR, et al. Sclerostin and DKK1 in postmenopausal osteoporosis treated with Denosumab. *J Bone Miner Res* 2012;27:2259–63.
  46. Ooms ME, Roos JC, Bezemer PD, van der Vijgh WJ, Bouter LM, Lips P. Prevention of bone loss by vitamin D supplementation in elderly women: a randomized double-blind trial. *J Clin Endocrinol Metab* 1995;80:1052–8.
  47. Prestwood KM, Pannullo AM, Kenny AM, Pilbeam CC, Raisz LG. The effect of a short course of calcium and vitamin D on bone turnover in older women. *Osteoporos Int* 1996;6:314–9.
  48. Ambroszkiewicz J, Klemarczyk W, Gajewska J, Chelchowska M, Strucinska M, Oltarzewski M, et al. [Effect of vitamin D supplementation on serum 25-hydroxyvitamin D and bone turnover markers concentrations in vegetarian children]. *Med Wieku Rozwoj* 2009;13:34–9.
  49. Herrmann M, Widmann T, Colaïanni G, Colucci S, Zallone A, Herrmann W. Increased osteoclast activity in the presence of increased homocysteine concentrations. *Clin Chem* 2005;51:2348–53.
  50. Herrmann M, Wildemann B, Claes L, Klohs S, Ohnmacht M, Taban-Shomal O, et al. Experimental hyperhomocysteinemia reduces bone quality in rats. *Clin Chem* 2007;53:1455–61.
  51. Herrmann M, Umanskaya N, Traber L, Schmidt-Gayk H, Menke W, Lanzer G, et al. The effect of B-vitamins on biochemical bone turnover markers and bone mineral density in osteoporotic patients: a 1-year double blind placebo controlled trial. *Clin Chem Lab Med* 2007;45:1785–92.
  52. Green TJ, McMahon JA, Skeaff CM, Williams SM, Whiting SJ. Lowering homocysteine with B vitamins has no effect on biomarkers of bone turnover in older persons: a 2-y randomized controlled trial. *Am J Clin Nutr* 2007;85:460–4.
  53. Sato Y, Honda Y, Iwamoto J, Kanoko T, Satoh K. Effect of folate and mecobalamin on hip fractures in patients with stroke: a randomized controlled trial. *J Am Med Assoc* 2005;293:1082–8.
  54. Saito M, Fujii K, Marumo K. Degree of mineralization-related collagen crosslinking in the femoral neck cancellous bone in cases of hip fracture and controls. *Calcif Tissue Int* 2006;79:160–8.

## 8. Danksagung

Diese Dissertation verdankt ihre Entstehung der Leitung und Hilfe vieler verschiedener Menschen, die, auf die eine oder andere Weise, ihre wertvolle Unterstützung in die Vorbereitung und Durchführung dieser Arbeit einfließen ließen.

Zuallererst gilt meine Wertschätzung meiner Betreuerin Prof. Dr. Rima Obeid. Sie verdient meinen tiefsten Dank für die freundliche Überlassung des interessanten Themas, ihre stets bedingungslose Hilfsbereitschaft und wertvolle Unterstützung, für viele engagierte und wegweisende Diskussionen und für stets konstruktive Kritik. Ihre exzellente Art des wissenschaftlichen Arbeitens hat mich geprägt und ihre nicht endende Ermutigung, die maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beitrug, werde ich nie vergessen.

Meine Wertschätzung und mein Dank gelten auch PD Dr. Stefan Gräber, ohne sein exzellentes Wissen und seine treue Unterstützung beim Design der Studie, der Randomisierung der Teilnehmer und der weiteren Auswertung und Interpretation der Daten wäre diese Arbeit nicht erfolgreich gewesen.

Herzlich bedanke ich mich bei Prof. Dr. Jürgen Geisel dem Leiter des Instituts für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin (Zentrallabor) in Homburg für seine stets fachlich kompetente und freundliche Unterstützung.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Susanne Kirsch-Dahmen für ihre fachlich exzellente und wertvolle Unterstützung und das Korrekturlesen. Mein Dank gilt ebenso auch allen anderen Kollegen des Instituts für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin (Zentrallabor), im speziellen Dr. Björn Hummel, Dr. Ulrich Hübner, Dr. Yannick Rabagny und auch den Mitarbeitern, die hier nicht explizit erwähnt sind, ohne deren wertvolle Unterstützung und Ermutigung diese Arbeit jedoch nicht hätte vollendet werden können.

Herzlicher Dank gebührt Dr. Rudolf Eckert und seinen früheren Kollegen der Geriatrischen Rehaklinik St. Ingbert, die in Studiendesign, Probandenrekrutierung und Sammlung von Proben involviert waren.

Von Herzen danke ich meinem Ehemann Torsten Kruse und meinen Freunden Nicole Klein und Nadine Finger für das Korrekturlesen und die geduldige Unterstützung während des Fertigstellens der Arbeit.

Zu guter Letzt danke ich meiner Familie und meinen Freunden für alle Ermutigung der letzten Jahre.

## 9. Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name	<b>Vera Ellen Kruse</b> , geb. Köhne
Adresse	Kantweg 33, 29614 Soltau
Handy	01577 4738743
E-Mail	kruse.vera@googlemail.com
Familienstand	verheiratet
Geburtsdaten	29.08.1977 in Soltau



### Beruflicher Werdegang

06/2013	Approbation als Ärztin
05/2013	2. Staatsexamen Humanmedizin
02/2012 – 01/2013	Praktisches Jahr am Städtischen Klinikum Neunkirchen/Saar Wahlfach: Anästhesie
2009/2010/2011	Famulaturen: Chirurgie, Pädiatrie
seit 10/2006	Studium der Humanmedizin an der Universität des Saarlandes
08/2005 – 09/2006	arbeitssuchend, Absolvierung von Pflegepraktika
11/2002 – 07/2005	Psychologin an den EURO-SCHULEN, Hoyerswerda
04/2002 – 10/2002	Honorarkraft in einer psychologischen Beratungsstelle, Dresden
10/1996 – 03/2002	Studium der Christlichen Psychologie an der „IGNIS-Akademie für Christliche Psychologie“, Kitzingen
07/1996	Abschluss: Abitur
1993-1996	Gymnasium Soltau
1987-1993	Kooperative Gesamtschule Schneverdingen, Gymnasialzweig
1983-1987	Grundschule I Schneverdingen